

Aus dem Institut für Virologie der Universität Zürich

(Direktor: Prof. Dr. R. Wyler)

Arbeit unter der Leitung von Dr. A. E. Metzler

**Vergleich eines temperatursensitiven Impfstammes
des IBR-Virus mit einem Feldstamm:
Wachstumseigenschaften, Antigenexpression
und Morphogenese**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

Vorgelegt von
Daniel Leutenegger
Tierarzt
von Greifensee (ZH)
und Horben (TG)

Genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. R. Wyler, Referent
Prof. Dr. E. Peterhans, Korreferent

Zürich 1988

Druckerei R. Mittner, Neuenhof



INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

2. KATHOLISCHES BUNDESGESAMT

2.1	Einleitung	1
2.2	Struktur	2
2.3	Einleitung	3
2.4	Struktur	4
2.5	Einleitung	5
2.6	Struktur	6
2.7	Einleitung	7
2.8	Struktur	8
2.9	Einleitung	9
2.10	Struktur	10
2.11	Einleitung	11
2.12	Struktur	12
2.13	Einleitung	13
2.14	Struktur	14
2.15	Einleitung	15
2.16	Struktur	16
2.17	Einleitung	17
2.18	Struktur	18
2.19	Einleitung	19
2.20	Struktur	20
2.21	Einleitung	21
2.22	Struktur	22
2.23	Einleitung	23
2.24	Struktur	24
2.25	Einleitung	25
2.26	Struktur	26
2.27	Einleitung	27
2.28	Struktur	28
2.29	Einleitung	29
2.30	Struktur	30
2.31	Einleitung	31
2.32	Struktur	32
2.33	Einleitung	33
2.34	Struktur	34
2.35	Einleitung	35
2.36	Struktur	36
2.37	Einleitung	37
2.38	Struktur	38
2.39	Einleitung	39
2.40	Struktur	40
2.41	Einleitung	41
2.42	Struktur	42
2.43	Einleitung	43
2.44	Struktur	44
2.45	Einleitung	45
2.46	Struktur	46
2.47	Einleitung	47
2.48	Struktur	48
2.49	Einleitung	49
2.50	Struktur	50
2.51	Einleitung	51
2.52	Struktur	52
2.53	Einleitung	53
2.54	Struktur	54
2.55	Einleitung	55
2.56	Struktur	56
2.57	Einleitung	57
2.58	Struktur	58
2.59	Einleitung	59
2.60	Struktur	60
2.61	Einleitung	61
2.62	Struktur	62
2.63	Einleitung	63
2.64	Struktur	64
2.65	Einleitung	65
2.66	Struktur	66
2.67	Einleitung	67
2.68	Struktur	68
2.69	Einleitung	69
2.70	Struktur	70
2.71	Einleitung	71
2.72	Struktur	72
2.73	Einleitung	73
2.74	Struktur	74
2.75	Einleitung	75
2.76	Struktur	76
2.77	Einleitung	77
2.78	Struktur	78
2.79	Einleitung	79
2.80	Struktur	80
2.81	Einleitung	81
2.82	Struktur	82
2.83	Einleitung	83
2.84	Struktur	84
2.85	Einleitung	85
2.86	Struktur	86
2.87	Einleitung	87
2.88	Struktur	88
2.89	Einleitung	89
2.90	Struktur	90
2.91	Einleitung	91
2.92	Struktur	92
2.93	Einleitung	93
2.94	Struktur	94
2.95	Einleitung	95
2.96	Struktur	96
2.97	Einleitung	97
2.98	Struktur	98
2.99	Einleitung	99
2.100	Struktur	100

Meinen Eltern
und
Carla
gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	
2.1. Zellen	4
2.2. Virusstämme	4
2.3. Seren	5
2.4. Monoklonale Antikörper	6
2.5. Einhaltung der Wachstumstemperaturen	6
2.6. Virustitration	7
2.6.1. Endverdünnungsmethode	7
2.6.2. Auszählungsmethode	7
2.7. Bestimmung der Plaquegrösse	8
2.8. Virusvermehrung und Virusernte	8
2.8.1. Virusvermehrung	8
2.8.2. Virusernte	9
2.8.2.1. Virusernte für die Untersuchung des Wachstumsverhaltens	9
2.8.2.2. Radioaktive Markierung und Ernte inokulierter Kulturen zur Gewinnung von Antigenen	9
2.8.3. Radioaktive Markierung und Ernte inokulierter Kulturen zur Ermittlung der zeitlichen Abfolge der Protein- und Antigenexpression	11
2.9. Natrium Dodecyl Sulfat Polyacrylamidgel Elektrophorese (SDS-PAGE)	11
2.10. Fluorogramm	12
2.11. Serologischer Nachweis viraler Proteine	13
2.11.1. Immunoblot	13
2.11.2. Radioimmunpräzipitation	14
2.12. Elektronenmikroskopische Untersuchungen	14
2.13. Zusammensetzung der verwendeten Medien und Lösungen	15
2.13.1. Nährmedien und Lösungen für die Arbeit mit Zellkulturen	15
2.13.2. Lösungen für die Gelelektrophorese	17
2.13.3. Lösungen für Immunoblot und Radioimmunpräzipitation	19

3. RESULTATE	
3.1. Wachstumsverhalten des Stammes RLB 106 und des Stammes Jura 78 bei verschiedenen Temperaturen	21
3.1.1. Plaquegrösse und Ausbildung des zytopathischen Effektes	21
3.1.2. Vermehrungskurve	22
3.2. Proteinexpression der Virusstämme bei verschiedenen Temperaturen	26
3.3. Serologischer Nachweis der bei verschiedenen Temperaturen exprimierten Virusproteine	27
3.3.1. Immunoblot	30
3.3.1.1. Zeitliche Folge der Proteinexpression und Nachweis der Antigene mit Serum 1	30
3.3.1.2. Antigennachweis mit Serum 2	31
3.3.1.3. Antigennachweis mit voradsorbiertem Serum 2	36
3.3.2. Radioimmunpräzipitation	40
3.4. Elektronenmikroskopische Untersuchungen	42
3.4.1. Untersuchungen an Ultradünnschnitten infizierter Zellkulturen	42
3.4.2. Untersuchung von Viruspartikeln aus Zellkulturüberständen im Negativkontrast Verfahren	43
4. DISKUSSION	46
5. ZUSAMMENFASSUNG	52
6. LITERATURVERZEICHNIS	53
7. VERDANKUNGEN	58
8. LEBENSLAUF	59

Liste der im Text verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATV	Trypsin-Versen Lösung
BHV-1	Bovines Herpesvirus 1
cpm	counts per minute
DNS	Desoxyribonukleinsäure
Fig.	Figur
gVP	glykosyliertes Virusprotein
Jura/37°C	Stamm Jura 78 bei 37°C vermehrt
Jura/39°C	Stamm Jura 78 bei 39°C vermehrt
M	Molarität (1 Mol/l)
mA	Milliampère
MC	Monoklonale Antikörper
MDBK-Zellen	Madin Darby Bovine Kidney Zellen
mV	Millivolt
mOsm	Milliosmol
PFU	Plaque bildende Einheit
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
p.i.	post infectionem
RIP	Radioimmunpräzipitation
RLB/37°C	Stamm RLB 106 bei 37°C vermehrt
RLB/39°C	Stamm RLB 106 bei 39°C vermehrt
s.	siehe
SDS-PAGE	Natrium Dodecyl Sulfat Polyacrylamidgel Elektrophorese
TCID ₅₀	50% Tissue Culture Infectious Dose
VP	Virusprotein
MW	Molekulargewicht

1. EINLEITUNG

Das bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) ist der Erreger der Infektiösen Bovinen Rhinotracheitis (IBR) und der Infektiösen Pustulösen Vulvovaginitis (IPV). Daneben ist BHV-1 als Abortursache von wirtschaftlicher Bedeutung und wurde auch bei Erkrankungen des zentralen Nervensystemes bei Kälbern nachgewiesen, sowie unter anderem bei Konjunktivitis, Mastitis, Metritis und Enteritis isoliert. BHV-1 ist weltweit verbreitet (Mayr et al., 1984; Gibbs und Rweyemamu, 1977). In der Schweiz wird die IBR/IPV durch Ausmerzungen serologisch positiver Tiere bekämpft.

Das Virus enthält eine doppelsträngige DNS in einem als Ikosaeder geformten Kapsid, das aus 162 Kapsomeren aufgebaut ist. Das Kapsid wiederum wird vom Tegument und von einer Hülle umschlossen (Roizman und Batterson, 1985). Der Durchmesser des behüllten Virus beträgt ungefähr 150 nm (Jasty und Chang, 1971).

Der Replikationszyklus lässt sich in folgende Schritte unterteilen (Roizman und Spear, 1973):

Adsorption (Haftung an die Zelloberfläche), Penetration (Eindringen in die Zelle), Uncoating (Freisetzung der Nukleinsäure), Biosynthese (Proteinsynthese im Zytoplasma, DNS-Synthese im Zellkern), Maturation (Zusammenbau der einzelnen Bausteine zu Viruspartikeln), Behüllung (Behüllung der Nukleokapside, vor allem durch Sprossung an der Kernmembran), Freisetzung (Transport der Viruspartikel zur Zelloberfläche, vermutlich in Zellkompartimenten ohne Kontakt zum Zytoplasma und Ausschleusung aus der Zelle).

Bislang sind bei BHV-1 ungefähr 15 Nichtstrukturproteine sowie über 30 Strukturproteine nachgewiesen worden, wovon 11 glykosyliert sind (Misra et al., 1981).

Bereits seit 1956 werden Impfstoffe gegen die IBR eingesetzt (Mann et al., 1983). So wurden zwischen 1975 und 1980 rund 100×10^6 Impfdosen verbraucht (Pastoret et al., 1980), und 1986 waren in den USA 14 Lebendvakzinen zugelassen (Whetstone et al., 1986).

Für epidemiologische Untersuchungen sollten Impfstämme von Feldvirusstämmen ohne grossen Aufwand unterschieden werden können. Diese Bedingung erfüllt ein Impfstamm mit der Bezeichnung RLB 106. Dabei handelt es sich um eine temperatursensitive (ts) Mutante, die sich bei Temperaturen über 39°C nicht mehr vermehrt (Zygraich et al., 1974 a, b) und sich durch diese Eigenschaft leicht von bekannten Feldstämmen abgrenzen lässt (Nettleton et al., 1984). Die Abklärung, ob ein Rind mit dieser Mutante oder mit wildtyp Virus infiziert worden ist, setzt allerdings eine Erregerisolation voraus.

Restriktionsenzymanalysen des Virusgenoms von Stamm RLB 106 unter Verwendung des Enzymes Eco R1 zeigten keine Unterschiede zum internationalen Referenzstamm BHV-1/Los Angeles (Thiry et al., 1983). Nettleton et al. (1984) fanden im Restriktionsmuster der Enzyme Eco R1 und Hind III keine Abweichungen gegenüber einem Vergleichsstamm. Mit dem Enzym Mbo 1, das die DNS in über 80 Fragmente zerschneidet, konnten sie Isolate aus experimentell infizierten Kälbern anhand geringer Differenzen im Restriktionsmuster der Mutante oder dem Vergleichsstamm zuordnen. Beim Vergleich der Proteinprofile verschiedener BHV-1 Stämme fiel auf, dass sich die Mutante bezüglich der Expression eines Nichtstrukturproteines eindeutig von anderen Stämmen unterschied (A. E. Metzler, nicht veröffentlichte Resultate).

Ziel dieser Arbeit war es, Wachstumseigenschaften, Antigenexpression und Morphologie der temperatursensitiven Mutante einerseits, sowie eines virulenten Feldstammes andererseits bei zwei verschiedenen Wachstumstemperaturen darzustellen.

Anhand der gewonnenen Resultate sollte erstens die Frage beantwortet werden, ob bei der Mutante im Vergleich zum Feldstamm gewisse Proteine fehlen, zusätzlich vorhanden sind, oder in veränderter Form exprimiert werden. Damit könnte abgeschätzt werden, ob im vakzierten Tier eine spezifische humorale Immunantwort induziert wird, die es erlauben würde, mittels serologischer Methoden zwischen geimpften und natürlich infizierten Tieren zu unterscheiden. Zweitens sollte abgeklärt werden, welcher Schritt im Replikationszyklus des Stammes RLB 106 von der Temperatursensitivität betroffen ist.

2. MATERIAL UND METHODEN

Zusammensetzung und Herstellung der mit (*) bezeichneten Medien und Lösungen sind unter 2.13. beschrieben.

2.1. Zellen

Die Vermehrung von Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) Zellen erfolgte in Gewebekulturflaschen (150 cm² Tissue Culture Flask, Corning Glass Works, New York, USA). Zweimal wöchentlich wurden die Zellen subkultiviert, indem sie nach Waschen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (*) mit Hilfe einer Trypsin-Versen Lösung (ATV) (*) vom Kulturgefäß gelöst und nach Bestimmung der Zellzahl 6×10^6 Zellen/150 cm² in 25 ml Wachstumsmedium (*) neu ausgesät wurden. Die Temperatur für die Anzüchtung betrug 37°C.

2.2. Virusstämme

Gearbeitet wurde mit folgenden BHV-1 Stämmen:

Jura 78 (Probst et al., 1985; Metzler et al., 1986)

RLB 106 (Zygraich et al., 1974 a, b)

Der Stamm Jura 78 ist im Jahre 1978 in der Schweiz von einem Tier mit akuter Erkrankung der Atemwege isoliert worden. Die temperatursensitive Mutante RLB 106 stellte Prof. Dr. Pastoret von der Universität Brüssel zur Verfügung, der sie, ausgehend von einer kommerziellen Vakzine (Tracherhine^R, Smith-Kline, RIT), dreimal plaquegereinigt hatte. In der Folge werden die Bezeichnungen Stamm RLB und Stamm Jura verwendet.

Beide Stämme lagen in Form einer bei -70°C gefrorenen Virussuspension als Ausgangsmaterial vor. Zur Gewinnung eines Stocks wurden die Virusstämme bei 37°C auf MDBK Zellen unter Verwendung einer Multiplizität von 0,1 TCID₅₀ vermehrt. Die Virusernte wurde portioniert und bei -70°C gelagert.

2.3. Seren

Die serologischen Untersuchungen erfolgten mit zwei verschiedenen Seren, die im eidgenössischen Vakzine-Institut in Basel gewonnen worden waren (Probst et al., 1985). Sie stammen von 2 Kühen, die experimentell mit dem Stamm Jura infiziert und später mit Dexamethason behandelt worden waren, was zu einem starken Anstieg des spezifischen Antikörpertiters geführt hatte. Die im Serumneutralisationstest (Metzler et al., 1986) bestimmten Endtiter der beiden Seren betrugen 1:725 (Serum 1), bzw. 1:1218 (Serum 2).

Für spezielle Abklärungen wurde Serum 2 vor seiner Verwendung im Immunoblot auf virusinfizierten Zellen adsorbiert. Dazu wurden je sechs von $4,5 \times 10^6$ MDBK-Zellen gebildete präkonfluente Monolayer in 75 cm²

Gewebekulturflaschen mit Stamm RLB bzw. mit Stamm Jura und als mockinfizierte Kontrolle mit Erhaltungsmedium (*) inokuliert. Die Multiplizität betrug 5 TCID₅₀ und das Inokulationsvolumen 3 ml Erhaltungsmedium. Je die Hälfte der virusinfizierten, bzw. mockinfizierten Zellkulturen wurden bei 37°C, bzw. bei 39°C inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit 12 ml Erhaltungsmedium ergänzt und bei den entsprechenden Temperaturen weiterbebrütet. 22 Stunden post inoculationem (p.i.) wurden die Kulturen mit Methanol fixiert. Auf den drei jeweils gleich infizierten und inkubierten Kulturen wurde Serum 2 in folgender Weise adsorbiert. 1,5 ml des in PBS 1:10 verdünnten Serums wurden auf den ersten Monolayer verbracht und während 5 Stunden bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Dann wurde das Serum entnommen, der Monolayer mit 2 ml PBS nachgewaschen, und die Waschflüssigkeit dem Serum zugegeben. Über Nacht erfolgte die Adsorption auf dem zweiten Monolayer, worauf wiederum das Serum entnommen und die Zellen mit 2 ml PBS nachgewaschen wurden. Zuletzt wurde das Serum für 5 Stunden auf dem dritten Monolayer adsorbiert, und wiederum mit 2 ml PBS nachgewaschen.



2.4. Monoklonale Antikörper

6 monoklonale Antikörper (MC) aus Überständen dichtgewachsener Hybridomakulturen (Metzler et al., 1985) wurden zur Untersuchung einzelner Proteine und Glykoproteine in der Radioimmunpräzipitation eingesetzt. 5 MC waren in Mäusen mit dem Stamm BHV-1/Los Angeles induziert worden. Der sechste, gegen ein Kapsidprotein von BHV-4 gerichtete MC wurde als negative Kontrolle verwendet. Die Bezeichnung der MC und ihre Spezifität sind in Tab. 1 angegeben (Friedli und Metzler, 1987).

Tab. 1: Bezeichnung und Spezifität der verwendeten monoklonalen Antikörper (MC). VP: Virusprotein, gVP: glykosyliertes Virusprotein

	MC 1963	MC 18	MC 60	MC 147	MC 1108	MC 1201
spezifisch gegen	BHV-4	VP 21	gVP 7/17/23	gVP 3/12	gVP 17A	VP 11/11A

2.5. Einhaltung der Wachstumstemperaturen

Die Versuche bei 37°C wurden in einem Brutschrank (Narco 6101, National Appliance Company, Portland, Oregon, USA) und diejenigen bei 39°C in einem Wasserbad (PF 623, Heto Lab Equipment, Birkerød, Dänemark) durchgeführt. Das Wasserbad wurde zum Schutz gegen Kontamination mit einem Desinfektionsmittel (Bathphix, Harleco, Herstal, Belgien) versetzt. Um die restriktive Temperatur (39°C) möglichst während des ganzen Versuches einzuhalten, wurden die Zellkulturen und alle für das Waschen und die Infektion benötigten Lösungen eine Stunde vor ihrer Verwendung ins Wasserbad verbracht, und alle Manipulationen in einem Brutraum bei 37°C vorgenommen. Damit kein Wasser eindringen konnte, wurden die Kulturflaschen mit elastischer Folie (Parafilm "M", American Can Company, Greenwich, USA) am Deckel abgedichtet, und die Platten für die Titration in Plastik eingeschweisst.

2.6. Virustitration

Für quantitative Aussagen wurde die Endverdünnungsmethode, für spezielle Untersuchungen zusätzlich die Auszählungsmethode (Plaques-Test) herangezogen.

2.6.1. Endverdünnungsmethode

MDBK Zellen wurden so in die 96 Dellen (Bodenfläche 0,3 cm²) von Mikrotiterplatten (Microtest, Becton Dickinson and Company, Oxnard, USA) ausgesät, dass jede Delle 1 x 10⁴ Zellen in 0,05 ml Wachstumsmedium enthielt. Während einer vierundzwanzigstündigen Inkubation bei 37°C bildeten sich präkonfluente Monolayer aus, auf denen die Titration durchgeführt wurde. Die zur Untersuchung bestimmten Proben wurden zunächst bei 900 x g geklärt, und darauf 0,2 ml vom Zentrifugationsüberstand im Verhältnis 1:10 in Erhaltungsmedium aufgenommen. Davon wurden mit Erhaltungsmedium weitere Verdünnungsstufen so hergestellt, dass der Verdünnungsfaktor von Stufe zu Stufe 10 betrug. Pro Verdünnungsstufe wurden in je vier Dellen 0,1 ml gegeben. Die Mikrotiterplatten wurden darauf während 72 Stunden bei 37°C bzw. 39°C inkubiert und die Zellen dann lichtmikroskopisch auf virusinduzierte zytopathische Veränderungen untersucht (Abrundung, z. T. Ablösung von der Unterlage, Zusammenballung, Ausbildung von vereinzelten Zytoplasmabrücken zwischen den Zellen). Die Berechnung der 50% Tissue Culture Infectious Dose (TCID₅₀) erfolgte nach der Methode von Spearman-Kärber, wie sie bei Bonin (1973) beschrieben ist.

2.6.2. Auszählungsmethode

Es kamen Makrotiterplatten mit 24 Dellen à 1,8 cm² Bodenfläche zur Anwendung (Nunc, NS Nunc, Roskilde, Dänemark), auf denen pro Delle 2 x 10⁵ Zellen in 0,5 ml Erhaltungsmedium ausgesät wurden. Vierundzwanzig Stunden später wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und je zwei Dellen mit 0,3 ml pro Verdünnungsstufe (s. 2.6.1.) beschickt. Nach einer Inkubation während einer Stunde bei 37°C oder 39°C wurden die Zellen erneut

mit PBS gewaschen und mit 0,4 ml Karboxymethylzellulosemedium (*) überschichtet. Darauf folgte die Bebrütung der Platten während zweiundsiebzig Stunden bei 37°C, bzw. 39°C. Anschliessend wurden die Zellen mit 3,7% Formalin in PBS fixiert, mit Kristallviolett (Merck, Darmstadt, BRD) gefärbt und mit Leitungswasser gespült. Es folgte die Auszählung der Plaques bei einer geeigneten Verdünnungsstufe und die Berechnung der Plaque bildenden Einheiten (PFU) im unverdünnten Material.

2.7. Bestimmung der Plaquegrösse

Auf zwei Makrotiterplatten wurde gleichzeitig mit dem gleichen Ausgangsmaterial folgender Versuch durchgeführt. Auf jeder Platte wurden die Zellen in je sechs Dellen mit verschiedenen Verdünnungsstufen des Stammes RLB, bzw. des Stammes Jura und als Kontrolle mit Erhaltungsmedium inokuliert. Dabei wählte man die Virusmenge so, dass in der ersten Delle eine Multiplizität von 10^1 PFU und in jeder folgenden jeweils eine um den Faktor 10 geringere Multiplizität eingesetzt wurde. Dann wurden die Platten wie unter 2.6.2. beschrieben inkubiert und gefärbt und anschliessend fotografiert. Nach vierfacher Vergrösserung der Aufnahmen konnten die Durchmesser von 60 einzeln liegenden Plaques ausgemessen und auf die natürliche Grösse umgerechnet werden. Von den Einzelwerten wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

2.8. Virusvermehrung und Virusernte

2.8.1. Virusvermehrung

$1,5 \times 10^6$ Zellen in 4 ml Erhaltungsmedium wurden in Kulturflaschen (25 cm² Tissue Culture Flask, Corning Glass Works, New York, USA) ausgesät und bei 37°C bebrütet. Zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens der beiden Stämme wurden die nach 24 Stunden ausgebildeten, präkonfluenten Monolayer mit einer niedrigen Multiplizität (0,1 TCID₅₀) inokuliert, zur

Produktion von Virusantigenen und für elektronenmikroskopische Untersuchungen mit einer hohen Multiplizität (5 TCID₅₀). Das Inokulationsvolumen betrug 1 ml Erhaltungsmedium. Als Kontrolle wurden Monolayer mit 1 ml Erhaltungsmedium inokuliert. Die Kulturgefäße wurden bei 37°C oder bei 39°C inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Zellen zweimal mit vorgewärmtem PBS gewaschen, mit 4 ml Erhaltungsmedium (für die Untersuchung des Wachstumsverhaltens) oder mit 4 ml Markiermedium 1 (*), bzw. 3 ml Markiermedium 2 (*) (für die Produktion von radioaktiv markierten Antigenen) überschichtet und bei den jeweiligen Temperaturen weiterbebrütet. Nach verschiedenen Inkubationszeiten und allfälliger radioaktiver Markierung konnte das Virusmaterial geerntet werden.

2.8.2. Virusernte

2.8.2.1. *Virusernte für die Untersuchung des Wachstumsverhaltens*

Der Zellkulturüberstand wurde während zehn Minuten bei 900 x g geklärt. Die Zellen wurden wieder mit 4 ml Erhaltungsmedium ergänzt, dann dreimal hintereinander zwecks Freisetzung des zellassoziierten Virus eingefroren und aufgetaut, und die resultierende Suspension ebenfalls bei 900 x g geklärt. Anschliessend erfolgte die Titration der Zentrifugationsüberstände nach der Endverdünnungsmethode bei 37°C und 39°C.

2.8.2.2. *Radioaktive Markierung und Ernte inokulierter Kulturen zur Gewinnung von Antigenen*

Die metabolische Markierung erfolgte mit [³⁵S] Methionin (Amersham International plc, England) oder mit [³H] Glukosamin (D-[6-³H] Glucosamin hydrochlorid) (Amersham), um speziell auch die glykosylierten Proteine darzustellen.

Für die Markierung der Antigene mit [³⁵S] Methionin wurden 7 Stunden post inoculationem 5-10 µCi [³⁵S] Methionin je ml Markiermedium 1 zugegeben. Die Markierung der Glykoproteine begann 4 1/2 Stunden p.i. durch Zugabe von 50 µCi [³H] Glukosamin je ml Markiermedium 2. Die Kulturen wurden solange

weiterinkubiert, bis mehr als 90% der Zellen Anzeichen eines zytopathischen Effektes zeigten, was 22 Stunden p.i. der Fall war. Als Kontrolle diente jeweils eine Zellkultur, die als Inokulum mit 1 ml Erhaltungsmedium beschickt, ansonsten aber gleich wie die virusinfizierten Kulturen behandelt wurde.

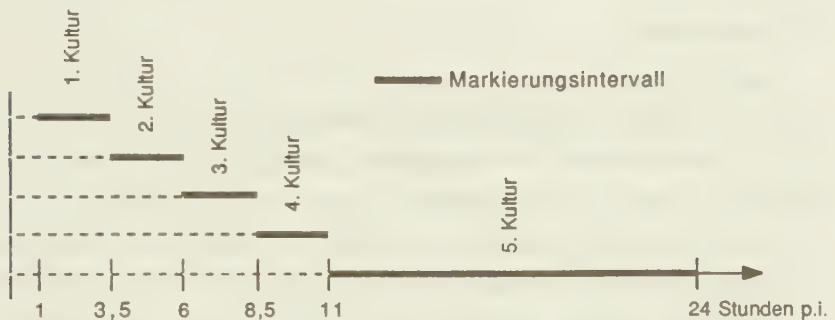
Zellkulturüberstand und Zellfraktion wurden getrennt geerntet. Der Kulturüberstand wurde bei 5000 x g geklärt, und das Virusmaterial anschliessend durch eine Ultrazentrifugation (100'000 x g, 90 Minuten) aus dem Zentrifugationsüberstand pelletiert (=Viruspellet) (Centrikon T-2060 Ultrazentrifuge, Tegimenta AG, Rotkreuz, Schweiz, Rotor SW 60). Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, mit Hilfe eines Magnetstäbchens von der Unterlage abgelöst und durch zweiminütige Zentrifugation bei 900 x g pelletiert (=Zellpellet).

Für den Nachweis des Virusmaterials im Fluorogramm und im Immunoblot wurde das Viruspellet in 65 µl und das Zellpellet in 500 µl SDS-PAGE Probenpuffer (*) aufgenommen. Beide wurden für drei Minuten in siedendem Wasser gekocht und zum Schluss eine Minute bei 10'000 x g zentrifugiert. Anschliessend erfolgte die Bestimmung der Radioaktivität (counts per minute, cpm) der Proben mit einem Liquid Scintillation Counter (Kontron AG, Zürich, Schweiz).

Für den Nachweis von Virusmaterial in der Radioimmunpräzipitation (RIP) fand ein spezieller RIP-Puffer (*) Verwendung. Das Zellpellet wurde in 4 ml RIP-Puffer während einer Stunde bei 4°C inkubiert. In der anschliessenden Ultrazentrifugation (100'000 x g während 90 Minuten) sedimentierten die nicht gelösten Bestandteile, worauf mit dem Überstand nach Messung der Radioaktivität die Immunpräzipitation durchgeführt wurde.

2.8.3. Radioaktive Markierung und Ernte inkulierter Kulturen zur Ermittlung der zeitlichen Abfolge der Protein- und Antigenexpression

Je 5 Zellkulturen wurden wie unter 2.8.1. angeführt mit Stamm RLB, bzw. mit Stamm Jura unter Verwendung einer hohen Multiplizität inkuliert und bei 37°C, bzw 39°C inkubiert. Die radioaktive Markierung mit 5-10 μCi [^{35}S] Methionin/ml (s. 2.8.2.2.) erfolgte in verschiedenen Intervallen, wie im folgenden Schema dargestellt:



Am Schluss des Markierungsintervalles wurden die Kulturen geerntet (s. 2.8.2.2.), und darauf die Proben im Immunoblot untersucht und autoradiographisch dargestellt (s. 2.11.1.). Als Kontrolle wurden mockinfizierte Zellkulturen eingesetzt.

2.9. Natrium Dodecyl Sulfat Polyacrylamidgel Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Elektrophorese wurde mit einem diskontinuierlichen Puffersystem nach Laemmli durchgeführt (Laemmli, 1970).

Das Trenngel (*) wurde jeweils am Vorabend gemischt, zwischen zwei Glasplatten (18 x 16 cm, Abstand 1,5 mm) gegossen und sofort mit wenig H_2O überschichtet, das nach Polymerisation des Gels durch ein Gemisch aus einem Teil Lower Gel Buffer (*) und drei Teilen H_2O ersetzt wurde, um ein Austrocknen zu verhindern. Am nächsten Tag erfolgte die Überschichtung mit dem

Sammelgel (*), in dem mit Hilfe eines Kammes 20 Kerben ausgespart wurden, in welche die Proben gefüllt werden konnten.

Die Elektrophorese erfolgte in einer LKB Apparatur (Vertical Electrophoresis Unit 2001, LKB, Luzern, Schweiz) unter Verwendung eines Tris-Glyzin-Laufpuffers (*). Es wurde solange ein Strom von konstant 25 mA durch das Gel geleitet, bis die Front des im SDS-PAGE Probenpuffer enthaltenen Bromphenolblaus bis auf einen Zentimeter an den unteren Rand herangewandert war.

2.10. Fluorogramm

Von den in infizierten und mockinfizierten Zellkulturen nach radioaktiver Markierung gewonnenen Proteinen wurde in der SDS-PAGE pro Probe ein Lysatvolumen, das 20'000 cpm entsprach, eingesetzt. Die durch die Elektrophorese gemäss ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine wurden danach in folgender Weise fixiert und fluorographisch dargestellt. Das Gel wurde dreissig Minuten in Fixationslösung (*) fixiert, zwecks Verstärkung des radioaktiven Signals sechzig Minuten in En^3Hance (New England Nuclear, Dreieich, BRD) eingelegt, für eine halbe Stunde unter fliessendem Wasser gewässert und schliesslich neunzig Minuten lang in einem Vakuumtrockner (Bio Rad, Glattbrugg, Schweiz) getrocknet. Mit dem Gel wurde während drei bis vierzehn Tagen ein Röntgenfilm (Fuji X-Ray Film, Fuji Photo Company LTD, Japan) bei -70°C exponiert.

Für die Bezeichnung der einzelnen Proteine wurde die an unserem Institut übliche Nomenklatur verwendet (Metzler et al., 1986). Dabei werden virale Strukturproteine (VP) und glykosylierte virale Strukturproteine (gVP) fortlaufend mit Zahlen bezeichnet, beginnend mit dem Protein mit dem höchsten Molekulargewicht. Virale Nichtstrukturproteine (VP) werden fortlaufend mit Kleinbuchstaben benannt, beginnend mit dem Nichtstrukturprotein mit dem höchsten Molekulargewicht.

2.11. Serologischer Nachweis viraler Proteine

Mit der Radioimmunpräzipitation und dem Immunoblot gelangten zwei verschiedene Nachweismethoden zur Anwendung. Dabei werden die viralen Proteine (=Antigene) unterschiedlich aufgearbeitet, und somit ihre Strukturen und Antigen determinanten den Antikörpern auf zwei verschiedene Arten präsentiert, was die Erfassung möglichst vieler Epitope erlaubt.

2.11.1. Immunoblot

Im Anschluss an die SDS-PAGE, die mit 20 µl Lysat pro Probe durchgeführt wurde, erfolgte in einem Blotkasten (Transblot Cell, Bio Rad Glattbrugg, Schweiz) unter Verwendung eines Tris-Glyzin-Transferpuffers (*) die Übertragung der Antigene vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosefolie (BA 85 Membranfilter, Schleicher und Schuell, Dassel, BRD). Durch das Anlegen einer horizontalen Spannung von 50 mV wanderten die Antigene über Nacht vom Gel auf die anodenseitig gelegene Nitrozellulosefolie. Danach wurde diese zweimal fünf Minuten gewässert und zwischen Filterpapier getrocknet. Mit der Folie wurde während 3 Tagen ein Röntgenfilm exponiert (=Autoradiogramm). Auf dem entwickelten Film wurden die markierten Antigene sichtbar, wodurch die Folie so zurechtgeschnitten werden konnte, dass die Proben, die mit demselben Serum getestet werden sollten, zusammen auf einen Streifen zu liegen kamen. In einer Plexiglaswanne, die so unterteilt war, dass jeder Streifen in ein separates Kompartiment gelegt werden konnte, wurden die Antigene auf der Folie serologisch nachgewiesen.

Die nachfolgend angeführten Mengenangaben sind pro Probe zu verstehen. Mit 2,5 ml Sättigungspuffer (*) wurden zunächst freie Proteinbindungsstellen 2,5 Stunden lang abgesättigt. Dann wurde die Folie mit 2,5 ml Waschpuffer (*) zweimal fünf Minuten gewaschen, und während 90 Minuten mit 50 µl in 2,5 ml Waschpuffer verdünntem Serum inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurde in einem nächsten Schritt die Folie mit 2,5 ml eines 1:2000 mit Waschpuffer

verdünnten Peroxidase-markierten anti-Rinderglobulins überschichtet (RAB/IgG (H + L)/PO, Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Holland). Nach 1 Stunde und Waschen mit PBS wurden als Substrat 2,5 ml einer Chloronaphthol/Wasserstoffsuperoxyd-Lösung (*) auf die Folie gebracht. Nach Ausbildung deutlich sichtbarer Banden konnte die Reaktion durch dreimaliges Wässern gestoppt werden. Die Folie wurde zwischen Fliesspapier getrocknet, und zum Schluss wiederum autoradiographiert.

2.11.2. Radioimmunpräzipitation

Zu je 250'000 cpm der metabolisch radioaktiv markierten und in RIP-Puffer solubilisierten Antigene wurden 5 µl Serum oder 100 µl monoklonale Antikörper zugegeben, worauf sich über Nacht bei 4°C die Immunkomplexe ausbilden konnten. Am nächsten Morgen wurden die Proben, die monoklonale Antikörper enthielten, mit 3 µl Rabbit-anti-Mouse Immunglobulin (RAM/Ig, Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Holland) versetzt und während einer Stunde bei 37°C inkubiert. Hernach wurden alle Proben mit 10 mg Protein A Sepharose (Protein A Sepharose CL 4B, Pharmacia, Laboratory Separation Division, Uppsala, Schweden), die in 200 µl RIP-Puffer suspendiert worden war, versetzt und während sechzig Minuten unter gelegentlichem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden anschliessend fünfmal mit RIP-Puffer gewaschen, in 65 µl SDS-PAGE Probenpuffer aufgenommen, drei Minuten in siedendem Wasser gekocht, und schliesslich kurz bei 10'000 x g zentrifugiert. Die Präzipitationsprodukte im Zentrifugationsüberstand wurden darauf gelelektrophoretisch aufgetrennt und fluorographisch dargestellt.

2.12. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Monolayer aus $1,5 \times 10^6$ Zellen/25 cm² wurden mit einer hohen Multiplizität mit Stamm RLB oder mit Stamm Jura inokuliert (s. 2.8.1.) und während 22 Stunden bei 37°C oder 39°C inkubiert. Darauf wurde der Zellrasen mit 0,5 ml ATV

abgelöst, in 2,5 ml Erhaltungsmedium aufgenommen und bei 100 x g während 10 Minuten pelletiert. Das Pellet wurde in 2,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Na Cacodylat (pH 7,4, 210 mOsm) resuspendiert und in Mikroröhrchen bei 500 x g während 20 Minuten zentrifugiert. Darauf wurde das Pellet während 30 Minuten weiter in Glutaraldehyd (4°C) fixiert, in 0,1 M s-Collidine (mit 5% Sucrose, pH 7,4, 300 mOsm) gewaschen und während 1 Stunde mit 1% Osmiumsäure in 0,1 M s-Collidine nachfixiert. In einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 10 Minuten in 70%, 80%, 96% und 3 mal 10 Minuten in 100% Alkohol) wurde das Pellet dehydriert, danach während 2 mal 10 Minuten in Propylenoxyd aufgenommen, über Nacht mit einem Epon 812-Propylenoxyd-Gemisch (1:1) behandelt, in Epon 812 eingebettet und während 2,5 Tagen bei 60°C polymerisiert. Dann wurden Ultradünnschnitte angefertigt (30-40 nm), auf 250 mesh Kupfernetzchen plaziert und mit Mg-Uranylacetat während 4 Minuten und mit Bleicitrat während 3 Minuten kontrastiert. Die Schnitte wurden in einem Philips EM 201 Elektronenmikroskop untersucht.

2.13. Zusammensetzung der verwendeten Medien und Lösungen

Um den jeweiligen pH Wert einzustellen, wurden die Medien, bzw. Lösungen mit Aqua dest., respektive Aqua bidest. bis fast auf das angegebene Volumen aufgefüllt, das pH mit NaOH oder HCl auf den gewünschten Wert eingestellt, und hernach das Volumen vervollständigt.

2.13.1. Nährmedien und Lösungen für die Arbeit mit Zellkulturen

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS):

-NaCl	8,00 g
-KCl	0,20 g
-KH ₂ HPO ₄	0,20 g
-Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	<u>2,90 g</u>
-Aqua bidest.	auffüllen auf 1000,00 ml

pH 7,2 mit NaOH einstellen, während 20 Min bei 120°C autoklavieren

Wachstumsmedium:

-Eagle's Minimum Essential Medium mit Earle's Salzen (EMEM, Amimed AG, Basel, Schweiz)	96,20 g
-Hepes Puffer (Calbiochem AG, Luzern, Schweiz)	<u>71,49 g</u>
-Aqua bidest.	auffüllen auf 10,00 l

pH 7,4 mit NaOH einstellen, Sterilfiltration, Aufbewahrung bei 4°C.
 Vor Verwendung Zugabe von 100 I.E. Penicillin/ml (Penicillin G Höchst,
 Höchst AG, Frankfurt am Main, BRD), 100 µg Streptomycin/ml
 (Streptothentat, Protochemie AG, Mitlodi, Schweiz), sowie 10% fetales
 Kälberserum (North American Biologicals, Florida, USA), hitzeinaktiviert
 bei 56°C während 30 Minuten.

ErhaltungsmEDIUM:

Zusammensetzung wie Wachstumsmedium, aber nur 2% Kälberserum

Markiermedium 1:

-Minimum Essential Medium ohne L-Methionin, ohne L-Glutamin (Gibco AG, Basel, Schweiz)	90 %
-ErhaltungsmEDIUM	10 %

Markiermedium 2:

Zusammensetzung wie Wachstumsmedium, aber nur 0,2% Kälberserum

Karboxymethylzellulosemedium:

ErhaltungsmEDIUM mit 0,8 % Karboxymethylzellulosesalz (BDH Chemicals,
 Pool, England)

Vor Verwendung Zugabe von 100 I.E. Penicillin/ml und 100 µg
 Streptomycin/ml, sowie 1% fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert bei 56 °C
 während 30 Minuten

Trypsin-Versen Lösung (ATV):

-NaCl	8,00 g
-KCl	0,20 g
-KH ₂ PO ₄	0,20 g
-Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,90 g
-Trypsin (Trypsin 1:250, Difco, Detroit, Michigan, USA)	1,25 g
-Versen (Titriplex III, Merck, Darmstadt, BRD)	0,25 g
-Penicillin	10 ⁵ I.E.
-Streptomycin	<u>0,10</u> g
-Aqua bidest.	auffüllen auf 1000,00 ml

Ueber Nacht bei 4°C rühren, dann pH 7,2 mit NaOH einstellen und steril filtrieren.

2.13.2. Lösungen für die Gelelektrophorese:

Acrylamid/Bisacrylamid-Stock (AC/B-Stock):

-Acrylamid (Fluka AG, Buchs, Schweiz)	58,40 g
-Bisacrylamid (Fluka AG, Buchs, Schweiz)	<u>1,60</u> g
-Aqua dest.	auffüllen auf 200,00 ml

Upper Gel Buffer (pH 6,8):

-Tris (Tris [hydroxymethyl] - aminomethan, MW 121,1 Calbiochem AG, Luzern, Schweiz)	30,30 g
-Natrium Dodecyl Sulfat (SDS, Bio Rad, Glattbrugg, Schweiz)	<u>2,00</u> g
-Aqua dest.	auffüllen auf 500,00 ml

pH 6,8 mit HCl einstellen

Lower Gel Buffer (pH 8,8):

-Tris	90,85 g
-Natrium Dodecyl Sulfat	<u>2,00</u> g
-Aqua dest.	auffüllen auf 500,00 ml

pH 8,8 mit HCl einstellen

Ammoniumpersulfat 10% (APS 10%):

frisch herstellen vor Gebrauch

-Ammoniumpersulfat (Bio Rad, Glattbrugg, Schweiz)	<u>0,10</u> g
-Aqua dest.	auffüllen auf 1,00 ml

Tris-Glyzin-Laufpuffer (10 x konzentriert)

-Tris	30,30 g
-Glycin (Glycin p.a., Merck, Darmstadt, BRD)	144,00 g
-Natrium Dodecyl Sulfat	<u>10,00</u> g
-Aqua dest.	auffüllen auf 10'000 ml

Trenngel:

-Lower Gel Buffer	8,00 ml
-AC/B Stock (30%)	10,00 ml
-Aqua dest.	14,00 ml
-APS 10%	50,00 µl

entgasen unter Vakuum, bis keine Luftblasen mehr aufsteigen

-Tetramethyl-Ethylendiamin (TEMED, Sigma Chemical Company, St. Louis, USA)	16,00 µl
--	----------

Sammelgel:

-Upper Gel Buffer	2,50 ml
-AC/B Stock (30%)	1,50 ml
-Aqua dest.	6,00 ml
-APS 10%	30 µl

entgasen unter Vakuum, bis keine Luftblasen mehr aufsteigen

-Tetramethyl-Ethylendiamin	10,00 µl
----------------------------	----------

SDS-PAGE Probenpuffer:

-Upper Gel Buffer	12,50 ml
-Bromphenolblau, 10 mg/ml Aethanol	1,50 ml
-Glycerol (Glycerin ca. 87%, Merck, Darmstadt, BRD)	15,00 ml
-Natrium Dodecyl Sulfat	3,00 g
-Mercaptoäthanol (2-Mercaptoäthanol, Merck, Darmstadt, BRD)	<u>1,00</u> ml
-Aqua dest.	auffüllen auf 100,00 ml

2.13.3. Lösungen für den Immunoblot und die Radioimmunpräzipitation

Tris-Glyzin-Transferpuffer:

-Methanol		1000,00 ml
-Glycin		70,00 g
-Tris		15,00 g
-Natrium Dodecyl Sulfat		<u>0,50</u> g
-Aqua dest.	auffüllen auf	5000,00 ml

Sättigungspuffer:

-Tris		30,00 g
-NaCl		40,60 g
-EDTA		9,30 g
-Nonidet P 40 (Sigma, Chemical Company, St. Louis, USA)		2,50 ml
-Gelatine (erwärmen)		<u>12,50</u> g
-Aqua dest.	auffüllen auf	5000,00 ml

Vor Gebrauch 5% normales Schweineserum zufügen

Waschpuffer:

Wie Sättigungspuffer, jedoch nur 1% Schweineserum

Chloronaphthol/Wasserstoffsuperoxyd-Lösung:

frisch herstellen vor Gebrauch

-4-chloro-1-Naphthol (Sigma, Chemical Company St. Louis, USA) 3mg/ml Methanol	5,40 ml
-Phosphatgepufferte Salzlösung	84,60 ml
-Wasserstoffsuperoxyd, 30%	18,00 µl

Radioimmunpräzipitations-Puffer (RIP-Puffer):

-Tris		0,60 g
-NaCl		0,85 g
-Triton X-100 (Merck, Darmstadt, BRD)		<u>1,00</u> ml
-Aqua dest.	auffüllen auf	100,00 ml

Fixationslösung:

-Methanol	600,00 ml
-Eisessig	<u>100,00</u> ml
-Aqua dest.	auffüllen auf 1000,00 ml

3. RESULTATE

3.1. Wachstumsverhalten des Stammes RLB 106 und des Stammes Jura 78 bei verschiedenen Temperaturen

3.1.1. Plauegrösse und Ausbildung des zytopathischen Effektes

Die von Stamm RLB 106 bei 37°C (Stamm RLB/37°C) gebildeten Plaques wiesen einen deutlich geringeren Durchmesser auf als diejenigen, die der Stamm Jura 78 bei 37°C (Stamm Jura/37°C) induzierte. (Tab. 2 und Abb. 1).

Tab. 2: Grösse der bei 37°C von Stamm RLB 106 und von Stamm Jura 78 gebildeten Plaques. Angegeben sind die Mittelwerte von je 60 einzeln liegenden Plaques, sowie die jeweilige Standardabweichung (s)

Virusstamm	Plauegrösse
	(Mittelwert und Standardabweichung)
RLB 106	0,34 mm(s= ± 0,16 mm)
Jura 78	0,80 mm(s= ± 0,24 mm)

Stamm Jura zeigte bei beiden Temperaturen sowohl in Bezug auf die Anzahl der Plaques, als auch in Bezug auf deren Grösse vergleichbare Ergebnisse (Abb. 1). Im Gegensatz dazu bildete Stamm RLB 106 bei einer Temperatur von 39°C (Stamm RLB/39°C) keine auszählbaren Plaques aus. Zytopathische Effekte waren in Abhängigkeit von der Multiplizität wohl zu beobachten. So wurde nach Inokulation von mehr als 1 PFU pro Zelle der ganze Zellrasen zerstört (Abb. 1, 10^0). Nach Inokulation von 0,1 PFU pro Zelle blieben Teile des Zellrasens intakt (Abb. 1, 10^{-1}). Plaques waren dabei nicht zählbar. Nach Inokulation von weniger als 0,01 PFU pro Zelle liessen sich dagegen lichtmikroskopisch keine Veränderungen an den Monolayern feststellen (Abb. 1, 10^{-2} bis 10^{-5}).

Von Stamm RLB/39° C primär infizierte Zellen wurden also zerstört, ohne dass eine Plaquebildung erfolgte.

3.1.2. Vermehrungskurve

Nach Inokulation von 0,1 TCID₅₀ pro Zelle war beim Stamm Jura sowohl bei 37°C als auch bei 39°C eine Latenzphase von ungefähr sieben Stunden festzustellen, auf die bei beiden Temperaturen eine Phase exponentiellen Wachstums folgte (Abb. 2c). Bei 39°C verlief die Virusproduktion beschleunigt. 10 Stunden p.i. war verglichen mit 37°C eine um $10^{1,7}$ TCID₅₀/ml höhere Virusausschüttung nachweisbar. Stamm Jura/39°C erreichte mit $10^{8,57}$ TCID₅₀/ml bereits 24 Stunden p.i. maximale Virustiter, während dies bei Stamm Jura/37°C erst 33 Stunden p.i. mit $10^{8,4}$ TCID₅₀/ml der Fall war. Dies entsprach einer Produktion von rund 900 infektiösen Viruspartikeln pro Zelle bei beiden Inkubationstemperaturen.

Nach Titration der Virusernten bei 39°C ergaben sich im wesentlichen gleiche Ergebnisse wie bei einer Temperatur von 37°C (Abb. 2d). Der grösste Unterschied betrug $10^{0,5}$ TCID₅₀/ml.

Stamm RLB zeigte bei 37°C ebenfalls eine Latenzphase von ungefähr sieben Stunden, um danach ins exponentielle Stadium überzugehen und 33 Stunden p.i. einen maximalen Titer von $10^{7,54}$ TCID₅₀/ml zu erreichen (Abb. 2a). Dies entsprach 1/10 der Virusproduktion von Stamm Jura. Darauf sank der Virustiter exponentiell mit einer Halbwertszeit von 10 Stunden, und damit deutlich schneller als bei Stamm Jura, was auf eine geringere Thermostabilität der Mutante hinweist.

Bei Stamm RLB/39°C liess sich eine Virusvermehrung nicht mit Sicherheit nachweisen. Niedrige, konstante Infektiositätstiter blieben bis 72 Stunden p.i. feststellbar. Ab 24 Stunden p.i. konnte nur noch zellassoziiertes Virus ermittelt werden. Die Zellrasen blieben während der ganzen Versuchsdauer bis auf wenige aggregierte Zellen unversehrt.

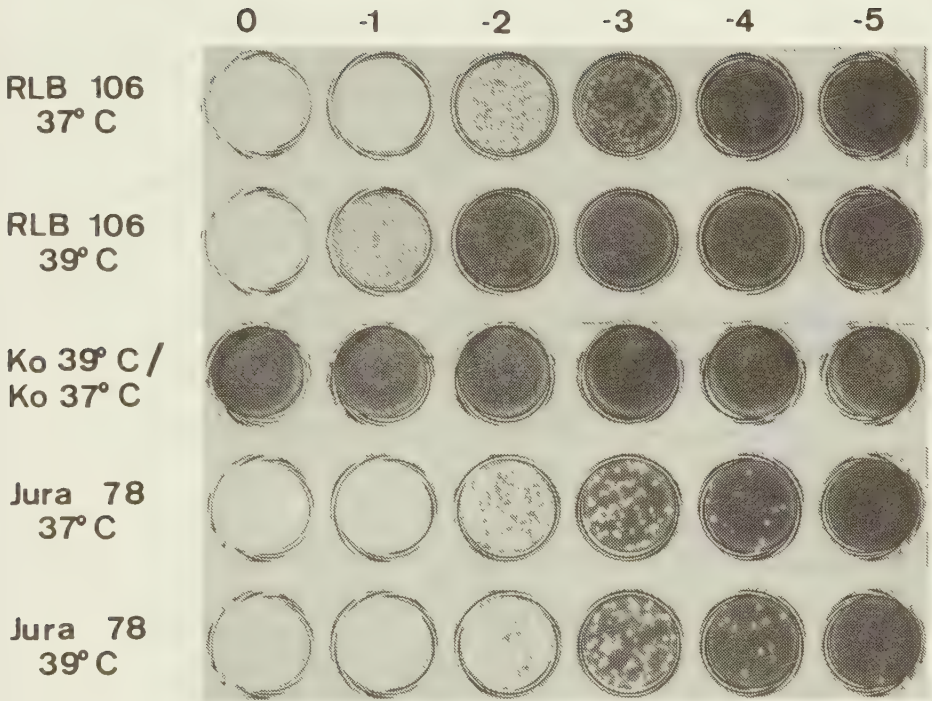


Abb. 1: Grösse der von Stamm RLB 106 bei 37°C und von Stamm Jura 78 bei 37°C, bzw. 39°C ausgebildeten Plaques, sowie Entwicklung des zytopathischen Effektes auf den mit Stamm RLB 106 infizierten Zellen in Abhängigkeit der Virusdosis pro Zelle. Monolayer waren mit einer Multiplizität von 10^0 bis 10^{-5} PFU infiziert worden.

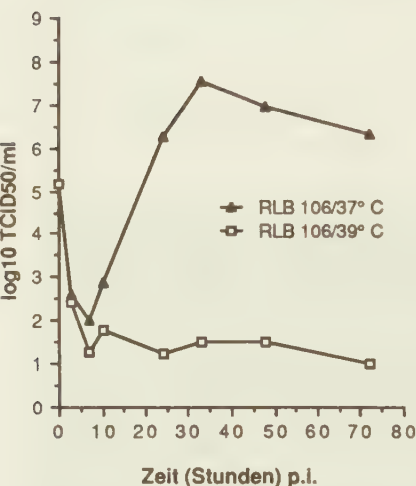
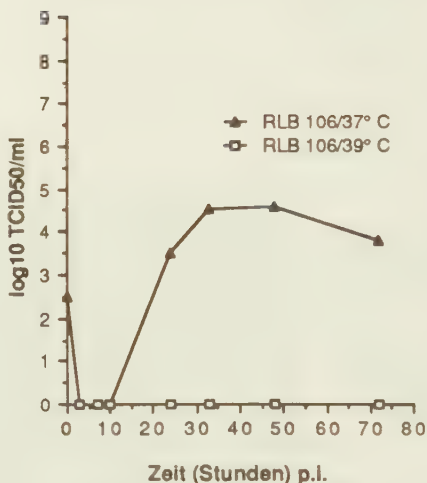
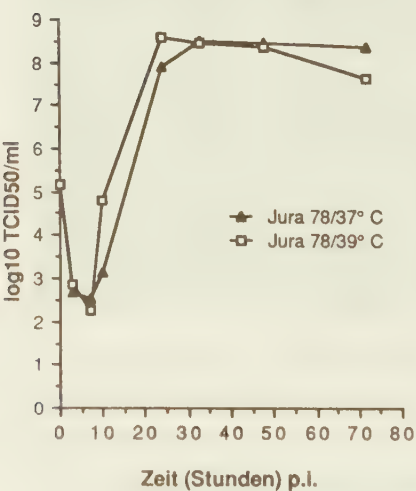
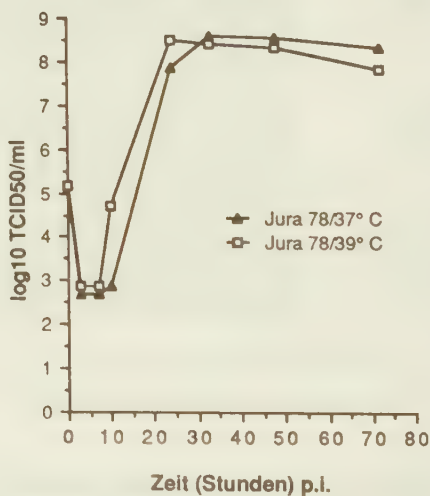
a: RLB 106 Titration bei 37° C**b: RLB 106 Titration bei 39° C****c: Jura 78 Titration bei 37° C****d: Jura 78 Titration bei 39° C**

Abb. 2: Wachstumsverhalten des Stammes RLB 106 und des Stammes Jura 78 auf MDBK Zellen bei 37°C und 39°C nach Inokulation von 0,1 TCID₅₀ pro Zelle. Angegeben ist jeweils die Summe von extrazellulärem und zellassoziiertem Virus. Die Proben wurden sowohl bei 37°C als auch bei 39°C titriert.

33 Stunden p.i. betrug der Unterschied zwischen der Virusausschüttung bei 37°C und der bei 39°C $10^{6,04}$ TCID₅₀/ml.

Stamm RLB/37°C bei 39°C titriert ergab einen Kurvenverlauf, der in der Form vergleichbar war mit demjenigen, der aus der Titration bei 37°C resultierte (Abb. 2b). Alle Werte lagen aber um einen Faktor $10^{2,4}$ bis 10^3 tiefer. Es zeigte sich auch hier, dass für die sichtbare Ausbildung eines zytopathischen Effektes bei 39°C allein die Virusdosis pro Zelle entscheidend war. So wurden die Monolayer auf den Mikrotiterplatten nur dort erkennbar verändert, wo die Multiplizität mehr als 0,1 TCID₅₀ betragen hatte.

In den Proben von Stamm RLB/39°C liess sich durch die Titration bei 39°C keine Infektiosität nachweisen.

Um den Titerverlauf von Stamm RLB/39°C genauer abzuklären, inokulierte man 5 Zellkulturen mit 0,1 TCID₅₀/Zelle und inkubierte sie bei 39°C. In Abständen von 24 Stunden wurde jeweils eine Kultur geerntet und der Virustiter bestimmt. Der Verlauf des Virustiters ist aus Tab. 3 ersichtlich.

Tab. 3: Vermehrung von Stamm RLB 106 bei 39°C nach Inokulation mit 0,1 TCID₅₀ pro Zelle. Die Titrationen erfolgten bei 37°C.

Inkubations- dauer (Stunden)	24	48	72	144	168
Virusernte (log ₁₀ TCID ₅₀ / ml)	1,5	1	1,5	1,25	<0,5

Ab 144 Stunden p.i. zeigten sich sowohl in den mit Stamm RLB infizierten, als auch in mockinfizierten Zellkulturen zunehmend Degenerationserscheinungen, was die Versuchsdauer beschränkte.

In gleicher Weise wie oben beschrieben infizierte und inkubierte Zellkulturen wurden vor der Ernte nach einem Mediumwechsel 48 Stunden bei 37°C weiterbebrütet. Dabei wuchsen die lädierten mockinfizierten Zellen wieder zu

einem konfluenten Monolayer aus. Bei den mit Stamm RLB infizierten Kulturen dagegen entwickelte sich im Verlaufe der 48 Stunden ein generalisierter zytopathischer Effekt und der Virustiter in jeder Probe stieg auf über 10^5 TCID₅₀/ml. Das Nachkommenvirus erwies sich wiederum als temperatursensitiv.

Der Virusstamm RLB vermochte also bei 39°C in irgendeiner Form während mindestens 168 Stunden in Zellkulturen seine Infektiosität zu erhalten, ohne seine Temperatursensitivität zu verlieren.

3.2. Proteinexpression der Virusstämme bei verschiedenen Temperaturen

Die nach Infektion mit 5 TCID₅₀ pro Zelle mit [³⁵S] Methionin bei 37°C radioaktiv markierten Proteine von Stamm RLB und von Stamm Jura zeigten nach Auftrennung mittels SDS-PAGE weitgehend übereinstimmende, jedoch in Einzelheiten unterscheidbare Profile (Abb. 3a).

Anhand der Proteinprofile von Zellfraktionen liess sich feststellen, dass das Nichtstrukturprotein VP I der Mutante ein vergleichsweise niedrigeres Molekulargewicht (Abb. 3a, Bahnen 2 und 3), das Strukturprotein VP 26 dagegen ein höheres Molekulargewicht aufwies. Das Nichtstrukturprotein VP o wurde von Stamm RLB nicht in erkennbarer Form exprimiert.

Anhand der Virusproteinprofile aus Zellkulturüberständen liess sich das unterschiedliche Wanderungsverhalten von VP 26 deutlicher erkennen (Abb. 3a, Bahnen 2' und 3').

Die Proteinmuster des Stammes Jura waren bei beiden Temperaturen identisch (Abb. 3a und b, Bahnen 3 und 3').

Die gesamte Proteinsyntheserate der Mutante war bei 39°C im Vergleich zu 37°C deutlich reduziert. Deshalb wurde in der SDS-PAGE von der nach Inkubation bei 39°C gewonnenen Zellfraktion die dreifache Menge Lysat eingesetzt, um im Fluorogramm quantitativ vergleichbare Signale zu erhalten.

Dabei wurden auch entsprechend mehr zelluläre Proteine mitgeführt, was bei der Beurteilung der Resultate berücksichtigt werden musste. VP 26, VP 1 und VP 0 zeigten dieselben Differenzen zwischen den Stämmen wie bei 37°C (Abb. 3b, Bahnen 2 und 3). GVP 12, VP 20 und VP 21 wurden von der Reduktion der Syntheserate deutlich stärker als die übrigen Proteine betroffen.

Vom Zellkulturüberstand des Stammes RLB/39°C musste in der SDS-PAGE zehnmal mehr Lysat eingesetzt werden als bei Stamm RLB/37°C. Dies war ein Hinweis darauf, dass die Freisetzung von Virusmaterial aus der Zelle bei 39°C deutlich beeinträchtigt war. Die Proteinprofile der beiden Stämme zeigten auch hier bezüglich gVP 12, VP 20 und VP 21 die bereits erwähnten Unterschiede (Abb. 3b, Bahnen 2' und 3'). Zusätzlich wies VP 11 der Mutante ein geringeres Molekulargewicht auf als der Wildstamm und VP 4 war kaum vorhanden.

Die Markierung mit [³H] Glukosamin bei 37°C ergab im Zellkulturüberstand für beide Stämme ein identisches Glykoproteinmuster (Abb. 3c, Bahnen 2' und 3'). Das Glykoproteinmuster von Jura/39°C war vergleichbar mit dem von Jura/37°C (Abb. 3c und 3d, Bahn 3'). Die Mutante zeigte bei 39°C im Vergleich zu Jura/39°C ein qualitativ identisches Muster, aber gVP 12 war deutlich schwächer vertreten als die übrigen Glykoproteine (Abb. 3d, Bahn 2').

3.3. Serologischer Nachweis der bei verschiedenen Temperaturen exprimierten Virusproteine

Hier ging es erstens darum, die antigenen Eigenschaften der von Stamm RLB exprimierten Proteine mit jenen von Stamm Jura zu vergleichen.

Zweitens sollten allfällige Unterschiede in der Antigenexpression der beiden Stämme bei 37°C und 39°C dargestellt werden.

Abb. 3: In der SDS-PAGE aufgetrennte und fluorographisch dargestellte Proteine bzw. Glykoproteine aus mockinfizierten, mit Stamm RLB 106 infizierten und mit Stamm Jura 78 infizierten Zellkulturen. Die Kulturen waren mit einer hohen Multiplizität infiziert worden, die Markierung erfolgte mit [^{35}S] Methionin, bzw. [^3H] Glukosamin.

z = zelluläres Protein, bzw. Glykoprotein

Fig. a und b: Mit [^{35}S] Methionin markierte Proteine nach Inkubation bei 37°C (a), bzw. 39°C (b).

Fig. c und d: Mit [^3H] Glukosamin markierte Glykoproteine nach Inkubation bei 37°C (c), bzw. 39°C (d).

Bahn 1: Zellfraktion von mockinfizierten Kulturen.

Bahn 2: Zellfraktion von RLB 106 infizierten Kulturen.

Bahn 3: Zellfraktion von Jura 78 infizierten Kulturen.

Bahn 1': Zellkulturüberstand von mockinfizierten Kulturen.

Bahn 2': Zellkulturüberstand von RLB 106 infizierten Kulturen.

Bahn 3': Zellkulturüberstand von Jura 78 infizierten Kulturen.

Proteine

Glykoproteine

37°C

39°C

Zellfraktion

1 2 3

Überstand

1' 2' 3'

a

b

Zellfraktion

1 2 3

Überstand

1' 2' 3'

C z

d z

-4

-11

-17A

-17

-20

-21

-23

-26

-8

-4

-11

-12

-17A

-17

-20

-21

-23

-26

-8

-7

-10

-12

-17A

-17

-23

Überstand

2' 3'

Überstand

2' 3'

2' 3'

2' 3'

3.3.1. Immunoblot

3.3.1.1. Zeitliche Folge der Proteinexpression und Nachweis der Antigene mit Serum 1

Nach Inokulation von Zellkulturen mit einer hohen Multiplizität wurden die Antigene in Intervallen (s. 2.8.3.) mit [^{35}S] Methionin metabolisch markiert, im Immunoblot serologisch nachgewiesen und hernach autoradiographisch dargestellt.

Bei Stamm Jura/37°C liessen sich 6 - 8,5 Stunden p.i. erste virusinduzierte Proteine, bzw. Glykoproteine erkennen (Abb. 4a' und 4b', Bahn 3). Zwischen 11 und 24 Stunden p.i. wurde ein Maximum viraler Antigene ausgebildet (Bahn 6). Nach Inokulation mit Stamm RLB/37°C waren bereits 3,5 bis 6 Stunden p.i. erste virale Syntheseprodukte aufzuzeigen (Abb. 4a und 4b, Bahn 3). VP o' wurde vom Serum 1 zu keinem Zeitpunkt erkannt, obwohl aus dem Autoradiogramm (Abb. 4a) ersichtlich war, dass es exprimiert wurde (Bahn 6). Die bei den Stämmen RLB und Jura unterschiedlichen Molekulargewichte von VP I und VP 26 beeinflussten deren Antigenität offenbar nicht, waren sie doch beide serologisch nachweisbar (Abb. 4b).

Bei Stamm Jura/39°C waren 3,5 - 6 Stunden p.i. die ersten Virusproteine erkennbar (Abb. 5a' und b', Bahn 3). Die Reihenfolge in der Synthese der einzelnen Antigene war dieselbe wie bei 37°C. Das von Stamm Jura/39°C exprimierte Antigenmuster liess sich nicht von demjenigen des Stammes Jura/37°C unterscheiden (Abb. 4b' und Abb. 5b', Bahn 6).

Stamm RLB/39°C exprimierte VP d und VP 11 bereits ab 1 - 3,5 Stunden p.i. (Abb. 5a und b, Bahn 2). Die Reihenfolge im Auftreten der Antigene war vergleichbar mit der bei 37°C. VP o' verhielt sich gleich wie bei Stamm RLB/37°C (Abb. 5a und 5b). VP 11, das in der SDS-PAGE schneller wanderte als dasjenige von Stamm RLB/37°C, wurde vom Serum erkannt (Fig 5b, Bahn 6). Das Glykoprotein gVP 12 war entsprechend seiner geringeren Expression nur schwach nachweisbar. Das bei 39°C von der Mutante ausgebildete

Antigenmuster entsprach mit Ausnahme des niedrigeren Molekulargewichtes von VP 11 demjenigen des Stammes RLB/37°C.

Die Darstellung der Zellkulturüberstände der oben beschriebenen Proben im Fluorogramm (nicht dokumentiert) zeigte, dass erst im Markierungsintervall von 11 - 24 Stunden p.i. ausreichend radioaktiv markiertes Virusmaterial der Stämme RLB/37°C und Jura/37°C für einen fluorographischen Nachweis freigesetzt wurde.

Nach Inokulation mit Stamm Jura/39°C war bereits im Intervall von 6 - 8,5 Stunden p.i. extrazelluläres Virusmaterial im Fluorogramm nachweisbar.

Nach Inokulation mit Stamm RLB/39°C liessen sich erst in der 11 - 24 Stunden p.i. radioaktiv markierten Probe freigesetzte Virusprodukte erkennen, obwohl die Proteinsynthese hier am frühesten eingesetzt hatte.

Der Stamm RLB zeichnete sich also durch ein frühes Einsetzen der viralen Proteinsynthese aus. Bei erhöhter Temperatur wurde die Biosynthese beider Stämme beschleunigt. Die Freisetzung von Virusprodukten des Stammes Jura erfolgte bei 39°C früher als bei 37°C. Bei Stamm RLB dagegen wurde die Freisetzung nachweisbarer Mengen von Virusmaterial in den Zellüberstand durch die höhere Inkubationstemperatur nicht begünstigt.

3.3.1.2. Antigennachweis mit Serum 2

Zur weiteren Abklärung der serologischen Eigenschaften von Stamm RLB wurden Immunoblots mit Serum 2 durchgeführt.

Die von Stamm RLB und von Stamm Jura nach Inokulation mit 5 TCID₅₀ pro Zelle produzierten Antigene liessen sich mit Serum 2 in vergleichbarer Art wie mit Serum 1 nachweisen (Abb. 4b und 4b' sowie Abb. 6a, Bahnen 2 und 3). Vp I und VP m des Stammes RLB wurden vom Serum 2 schwächer erkannt, was auf Unterschiede in der Immunreaktion der beiden Spendertiere deutet. VP o und VP o' waren auch mit Serum 2 nicht eindeutig nachzuweisen (Abb. 6a, Bahn 2).

Abb. 4: Immunoblot und Autoradiogramm von in Intervallen mit [^{35}S] Methionin markierten Antigenen von Stamm RLB 106 und von Stamm Jura 78. Als Kontrolle wurden mockinfizierte Kulturen verwendet. Die Inkubationstemperatur betrug 37°C. Die in den einzelnen Bahnen aufgetrennten Proben entsprechen einer Antigenmenge aus ca. 70'000 Zellen.

Fig. a und b: Stamm RLB 106: Autoradiogramm (a) und Immunoblot mit Serum 1 (b)

Fig. a' und b': Stamm Jura 78: Autoradiogramm (a') und Immunoblot mit Serum 1 (b')

Bahn 1: Proteinmuster aus mockinfizierten, von 1 - 3,5 Stunden p.i. markierten Zellen

Bahn 2: 1 - 3,5 Stunden p.i. markierte Antigene

Bahn 3: 3,5 - 6 Stunden p.i. markierte Antigene

Bahn 4: 6 - 8,5 Stunden p.i. markierte Antigene

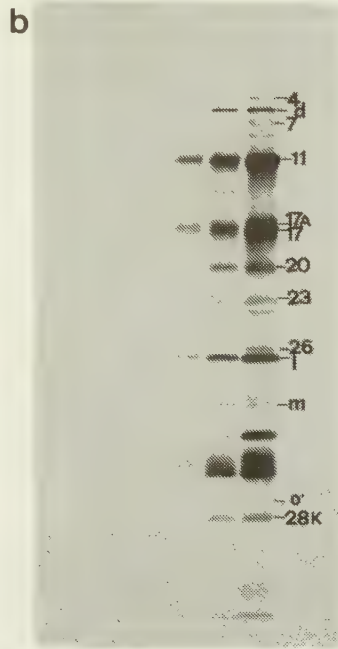
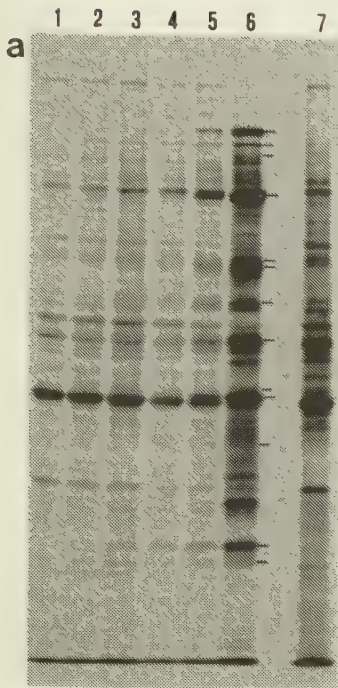
Bahn 5: 8,5 - 11 Stunden p.i. markierte Antigene

Bahn 6: 11 - 24 Stunden p.i. markierte Antigene

Bahn 7: Proteinmuster aus mockinfizierten, von 11 - 24 Stunden p.i. markierten Zellen.

STAMM RLB 106

37°C



STAMM JURA 78

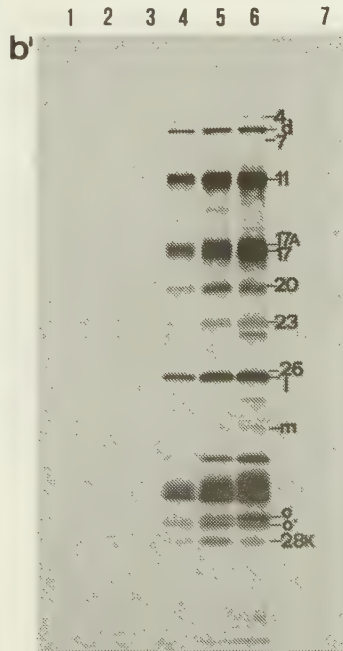
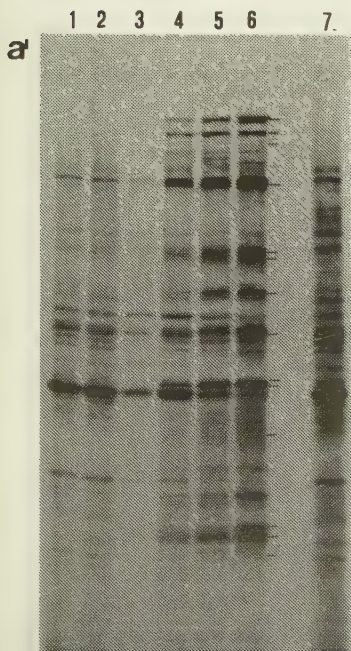


Abb. 5: Immunoblot und Autoradiogramm von in Intervallen mit [^{35}S] Methionin markierten Antigenen von Stamm RLB 106 und von Stamm Jura 78. Als Kontrolle wurden mockinfizierte Kulturen verwendet. Die Inkubationstemperatur betrug 39°C. Die in den einzelnen Bahnen aufgetrennten Proben entsprechen einer Antigenmenge aus ca. 70'000 Zellen.

Fig. a und b: Stamm RLB 106: Autoradiogramm (a) und Immunoblot mit Serum 1(b)

Fig. a' und b': Stamm Jura 78: Autoradiogramm (a') und Immunoblot mit Serum 1(b')

Bahn 1: Proteinmuster aus mockinfizierten, von 1 - 3,5 Stunden p.i. markierten Zellen

Bahn 2: 1 - 3,5 Stunden p.i. markierte Antigene

Bahn 3: 3,5 - 6 Stunden p.i. markierte Antigene

Bahn 4: 6 - 8,5 Stunden p.i. markierte Antigene

Bahn 5: 8,5 - 11 Stunden p.i. markierte Antigene

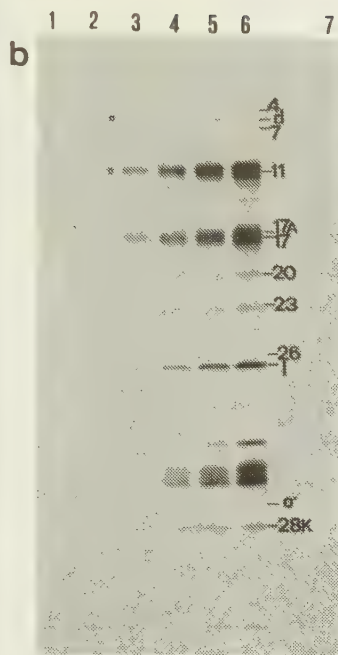
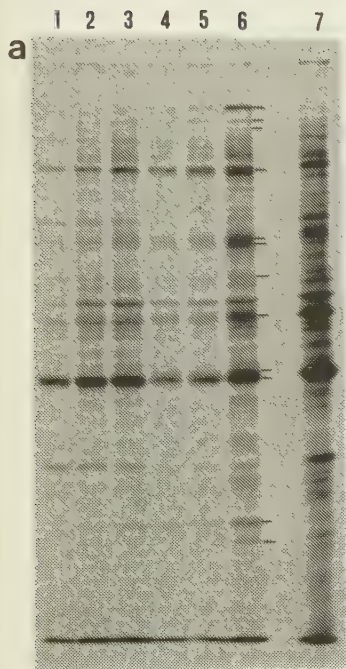
Bahn 6: 11 - 24 Stunden p.i. markierte Antigene

Bahn 7: Proteinmuster aus mockinfizierten, von 11 - 24 Stunden p.i. markierten Zellen.

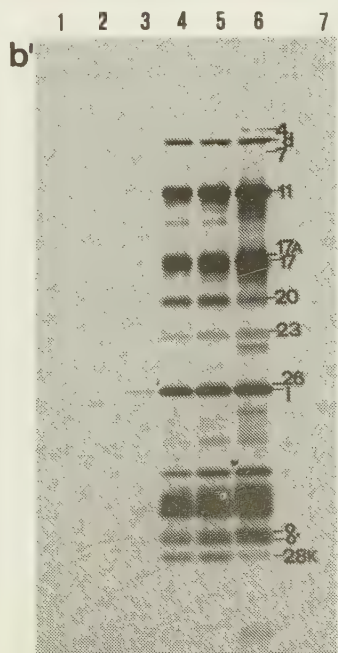
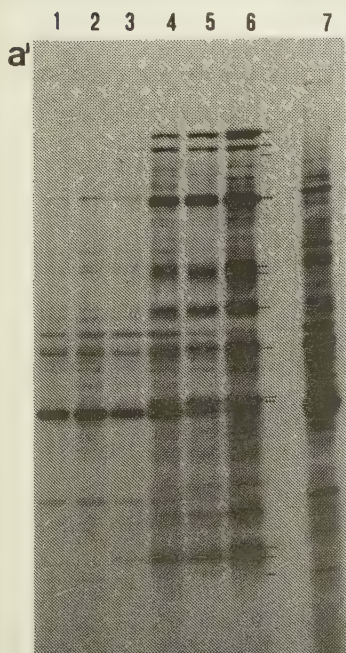
Nur schwach erkennbare Banden wurden mit ◦ bezeichnet

STAMM RLB 106

39°C



STAMM JURA 78



3.3.1.3. Antigennachweis mit voradsorbiertem Serum 2

Zur weiteren Abklärung bezüglich der serologischen Eigenschaften von VP o' des Stammes RLB sowie zur Beantwortung der Frage, ob VP o von der Mutante nicht, oder in einer antigen verschiedenen Form exprimiert wird, wurden Immunoblots mit Serum 2 nach Adsorption auf virusinfizierten Zellkulturen durchgeführt (s. 2.3.).

a) Adsorption des Serums auf mit Stamm Jura/37°C infizierten Kulturen

Im homologen System (d.h. gegen Stamm Jura/37°C) liessen sich VP 9, VP 17A/17 und VP 28K schwach nachweisen (Abb. 6d, Bahn 3). Gewisse Antikörper wurden also durch die Adsorption nicht eliminiert, vermutlich, weil die entsprechenden Antigendeterminanten in den fixierten Zellkulturen nicht zugänglich waren.

Im heterologen System (d.h. im Test gegen Stamm RLB/37°C) ergab sich ausser bezüglich VP 9 ein identisches Resultat (Abb. 6d, Bahn 2). VP 9 liess sich nicht nachweisen. In nicht gezeigten Immunoblots mit weiteren Seren war VP 9 deutlich nachzuweisen, was individuelle Immunreaktionen der Tiere widerspiegelt. Die während der Adsorption nicht gebundenen Antikörper gegen dieses Strukturprotein erkannten also im nachfolgenden Immunoblot VP 9 von Stamm RLB/37°C nicht. Die im Fluorogramm und im Immunoblot für VP 26, VP I und VP o nachgewiesenen Unterschiede zwischen den beiden Stämmen schlugen sich serologisch nicht nieder.

b) Adsorption des Serums mit Stamm RLB/37°C infizierten Kulturen

Das Resultat des Immunoblots mit Stamm RLB/37°C Antigen (d.h. im homologen System) entsprach dem oben erwähnten, indem VP 9 nicht nachzuweisen war (Abb. 6c, Bahn 2). Wie die Reaktion mit Stamm Jura Antigen (d. h. im heterologen System) zeigte, waren Antikörper gegen einzelne Epitope von VP 9 nach der Adsorption aber noch immer vorhanden (Abb. 6c, Bahn 3).

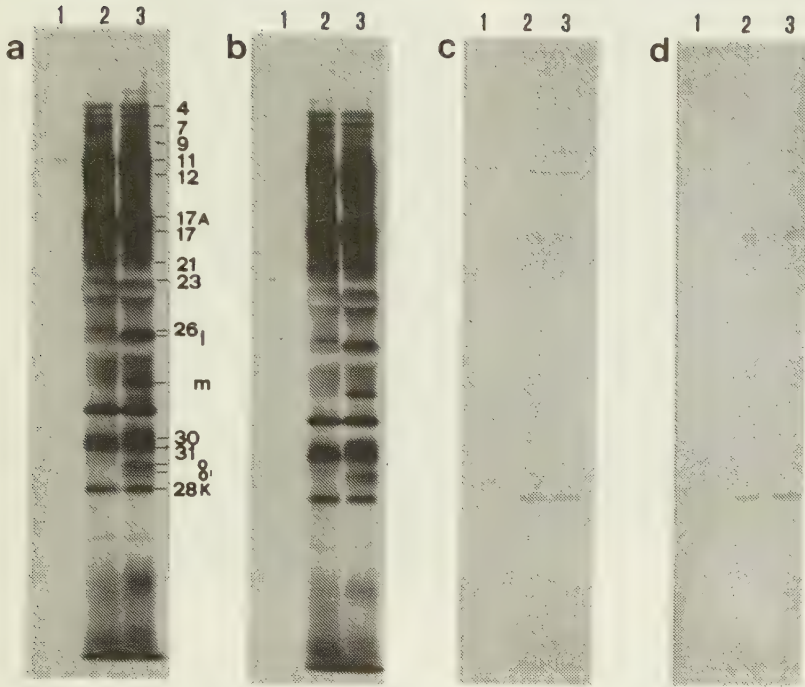


Abb. 6: Serologischer Nachweis der nach Inkubation bei 37°C gewonnenen Antigene von Stamm RLB 106 (Bahn 2), bzw. Stamm Jura 78 (Bahn 3) mit verschieden vorbehandeltem Serum 2 im Immunoblot. Als Kontrolle dienen mockinfizierte Zellen (Bahn 1).

- Fig. a: Immunoblot mit unbehandeltem Serum 2
- Fig. b: Immunoblot mit auf mockinfizierten Zellen voradsorbiertem Serum 2
- Fig. c: Immunoblot mit auf RLB 106 infizierten Zellen voradsorbiertem Serum 2
- Fig. d: Immunoblot mit auf Jura 78 infizierten Zellen voradsorbiertem Serum 2

Abb. 7: Mittels SDS-PAGE aufgetrennte und fluorographisch dargestellte Immunpräzipitate von [^{35}S] Methionin markierten Antigenen mit Serum 2, bzw. mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern (MC).

Fig. a und a': Präzipitationsmuster mit Antigenen der Stämme RLB 106/37°C (a) und RLB 106/39°C (a')

Fig. b und b': Präzipitationsmuster mit Antigenen der Stämme Jura 78/37°C (b) und Jura 78/39°C (b').

Bahn 1: Proteinprofil von RLB 106, bzw. Jura 78 infizierten, solubilisierten Zellen

Bahn 2: Präzipitationsmuster von Serum 2

Bahn 3: Präzipitationsmuster von MC 1963

Bahn 4: Präzipitationsmuster von MC 18

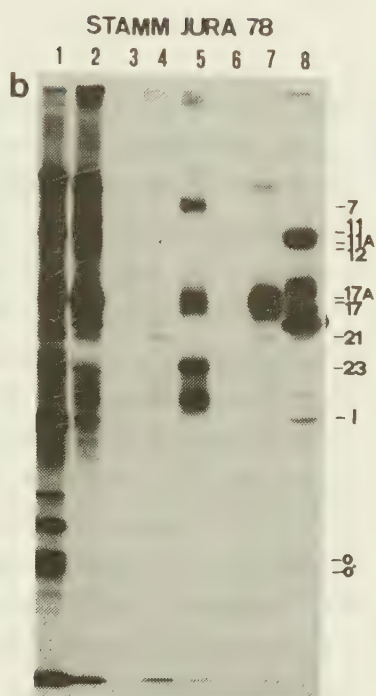
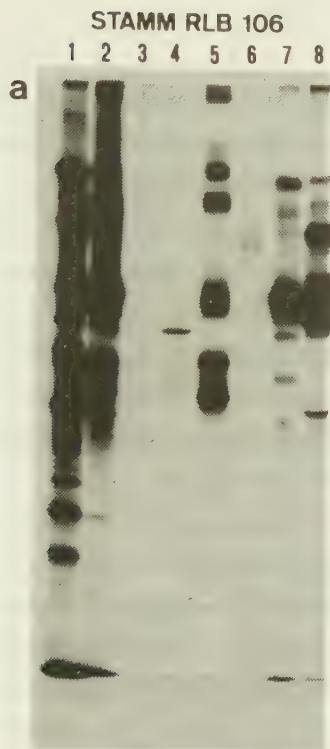
Bahn 5: Präzipitationsmuster von MC 60

Bahn 6: Präzipitationsmuster von MC 147

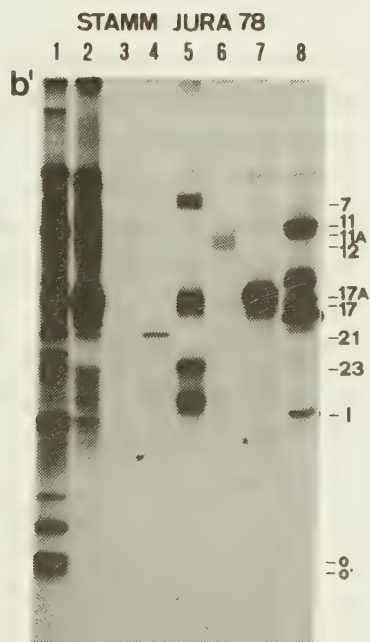
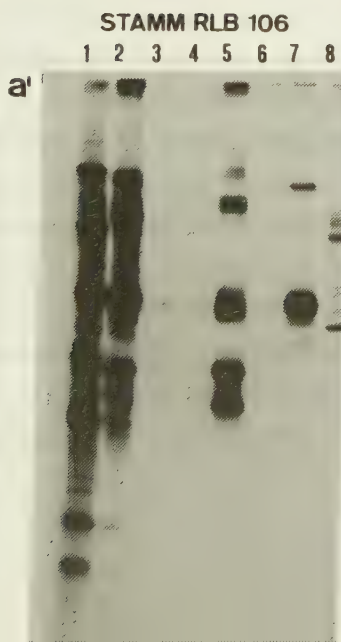
Bahn 7: Präzipitationsmuster von MC 1108

Bahn 8: Präzipitationsmuster von MC 1201

37°C



39°C



Die mit VP o und VP o' des Stammes Jura/37°C reagierenden Antikörper konnten sowohl durch Adsorption mit Jura/37°C als auch mit RLB/37°C infizierten Zellen eliminiert werden.

c) Adsorption des Serums mit Stamm RLB/39°C und mit Stamm Jura/39°C infizierten Kulturen

Sowohl die in den homologen als auch die in den heterologen Systemen gewonnenen Resultate waren identisch mit den oben beschriebenen. Die bei Stamm RLB bei 39°C auftretenden Besonderheiten von VP 11 und gVP 12 wurden vom Serum 2 nach Adsorption nicht erfasst.

d) Adsorption des Serums auf mockinfizierten Kulturen

Die Ergebnisse von Immunoblots mit auf mockinfizierten Kulturen voradsorbiertem und mit unbehandeltem Serum liessen sich nicht voneinander unterscheiden (Abb. 6a und b). Insbesondere war VP 9 des Stammes RLB schwach nachweisbar.

3.3.2. Radioimmunpräzipitation

Die antigenen Eigenschaften einzelner viraler Proteine und Glykoproteine wurden mit Serum 2 und mit monoklonalen Antikörpern (MC) (s. 2.4.) in der Radioimmunpräzipitation weiter untersucht. Die Präzipitation wurde sowohl mit [³⁵S] Methionin markierten, als auch mit [³H] Glukosamin markierten Antigenen durchgeführt, um speziell auch das Verhalten der immunologisch wichtigsten Glykoproteine zu prüfen.

Die Immunpräzipitate der Stämme Jura und RLB mit Serum 2 zeigten vergleichbare Muster (Abb. 7, Bahn 2). VP o und VP o' liessen sich nicht sicher darstellen, so dass ein Vergleich der beiden Stämme diesbezüglich nicht möglich war.

Die Proteinmuster der Stämme RLB/37°C und Jura/37°C liessen sich auch nach Radioimmunpräzipitation mit den verschiedenen MC nicht voneinander unterscheiden (Abb. 7a und b). Die Spezifität der MC entsprach dabei den Resultaten, wie sie von Friedli und Metzler (1987) beschrieben worden sind (s. 2.4.). Insbesondere wurde VP 11 in zwei Banden präzipitiert (VP 11 und VP 11A) (Abb. 7a und b, Bahn 8). Zusammen mit den jeweiligen Zielantigenen wurden zum Teil Proteine präzipitiert, die strukturell eng mit den ersten verbunden sind, und deshalb durch die Solubilisation nicht abgetrennt wurden. Diese mitpräzipitierten Proteine waren bei beiden Stämmen identisch.

Die MC reagierten mit den von Stamm Jura/39°C gewonnenen Antigenen wie mit denjenigen des Stammes Jura/37°C (Abb. 7b und b').

Bei Stamm RLB/39°C reagierte MC 18 mit VP 21 nicht eindeutig (Abb. 7a', Bahn 4), vermutlich bedingt durch die reduzierte Synthese dieses Proteins bei 39°C. MC 1201 reagierte mit VP 11 nur sehr schwach, und präzipitierte dabei nur eine Bande (Abb. 7a', Bahn 8). MC 147 reagierte nicht mit gVP 3/12 (Abb. 7a', Bahn 6).

Die Radioimmunpräzipitationen mit [³H] Glukosamin markiertem Virusmaterial des Stammes Jura/37°C und des Stammes RLB/37°C ergaben übereinstimmende Resultate (nicht dokumentiert). Im Gegensatz zur Markierung mit [³⁵S] Methionin waren hier die von MC 147 präzipitierten Banden des gVP 3/12 wesentlich deutlicher zu erkennen.

Die mit Stamm Jura/39°C erhaltenen Präzipitationsmuster liessen sich nicht von denjenigen des Stammes Jura/37°C unterscheiden. Bei RLB/39°C wurde gVP 3/12 eindeutig nicht präzipitiert.

Tabelle 4 fasst die Ergebnisse der Radioimmunpräzipitation zusammen.

Tab. 4: Resultate der Immunpräzipitation der bei 37°C, bzw. bei 39°C vermehrten Stämme RLB 106 und Jura 78 mit monoklonalen Antikörpern.
 +: deutliche Präzipitation +/-: schwache Präzipitation -: keine Reaktion

		Stamm RLB 106		Stamm Jura 78	
		Vermehrung bei 37°C	Vermehrung bei 39°C	Vermehrung bei 37°C	Vermehrung bei 39°C
Spezifität und Reaktion der MC	MC 1963 (Kontrolle)	-	-	-	-
	MC 18 (VP 21)	+	+	+	+
	MC 60 (gVP 7/17/23)	+	+	+	+
	MC 147 (gVP 3/12)	+	-	+	+
	MC 1108 (gVP 17A)	+	+	+	+
	MC 1201 (VP 11/11A)	+	+	+	+
			+	+	+

3.4. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

3.4.1. Untersuchungen an Ultradünnschnitten infizierter Zellkulturen

Zwanzig Stunden nach Inokulation mit Stamm Jura und Inkubation bei 37°C liessen sich in Ultradünnschnitten folgende Partikel unterscheiden (Abb. 8b):

- Nackte Kapside im Zellkern (Pfeilkopf)
- Behüllte Kapside, aggregiert in intranukleären Vakuolen
- An der inneren Kernmembran sprossende Kapside (schlanker Pfeil)
- Wenige behüllte Viren im Zytoplasma, z.T. mit Einlagerungen von elektronendichtem Material zwischen Kapsid und Hülle (dicker Pfeil)
- Behüllte Viren ausserhalb der Zellen mit Einlagerungen von elektronendichtem Material zwischen Kapsid und Hülle (dicker Pfeil)
- Elektronendichte runde Körper ausserhalb der Zellen ohne erkennbare Innenstruktur

Dieselben Partikel liessen sich auch bei Stamm RLB/37°C (Abb. 8a) und Stamm Jura/39°C (Abb. 8b') nachweisen.

Morphologische Besonderheiten zeigten sich in den mit Stamm RLB/39°C infizierten Zellkulturen (Abb. 8a'). Die Produktion von Viruspartikeln liess sich nachweisen. Pro Zellanschnitt und pro Blickfeld waren jedoch weniger Partikel zu finden als unter den anderen Bedingungen. Unbehüllte Viren fanden sich im Zellkern wie unter permissiven Bedingungen (Pfeilkopf), und auch Sprossungen an der Kernmembran waren zu beobachten (schlanker Pfeil). Im Zytoplasma waren in Kernnähe behüllte Viren anzutreffen, aber Einlagerungen von elektronendichtem Material fehlten. Daneben fanden sich elektronendichte runde Körper ohne Innenstruktur. Extrazellulär wurden ausschliesslich elektronendichte Körper ohne Innenstruktur festgestellt, die einen geringeren Durchmesser als Virionen der übrigen Stämme aufwiesen (weisser Pfeil).

3.4.2. Untersuchung von Viruspartikeln aus Zellkulturüberständen im Negativkontrast Verfahren

In den Zellkulturüberständen der Stämme RLB/37°C sowie Jura/37°C und 39°C liessen sich vor allem behüllte und vereinzelt unbehüllte Viruspartikel erkennen. Im unbehandelten Zellüberstand von RLB/39°C waren dagegen keine Viren zu finden. Erst nach Anreicherung mittels Ultrazentrifugation liessen sich Viruspartikel ohne Hülle nachweisen.

Abb. 8: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten infizierter Zellen.

K: Zellkern Z: Zytoplasma E: Extrazellulärer Raum

Fig. a: Stamm RLB 106 bei 37°C vermehrt

Fig. b: Stamm Jura 78 bei 37°C vermehrt

Fig. a': Stamm RLB 106 bei 39°C vermehrt

Fig. b': Stamm Jura 78 bei 39°C vermehrt

Pfeilkopf : Kapside

schlanker Pfeil : sprossende Kapside

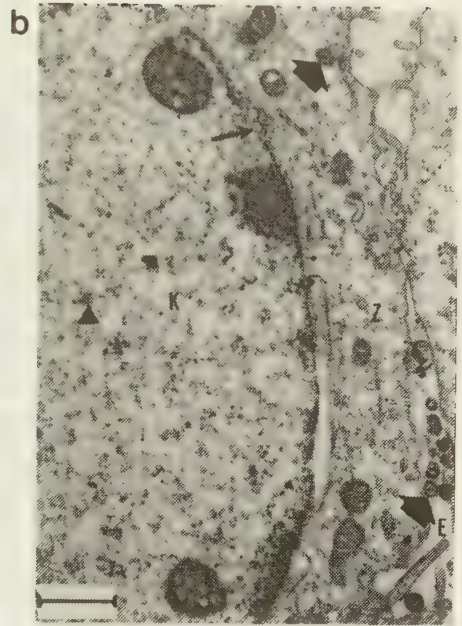
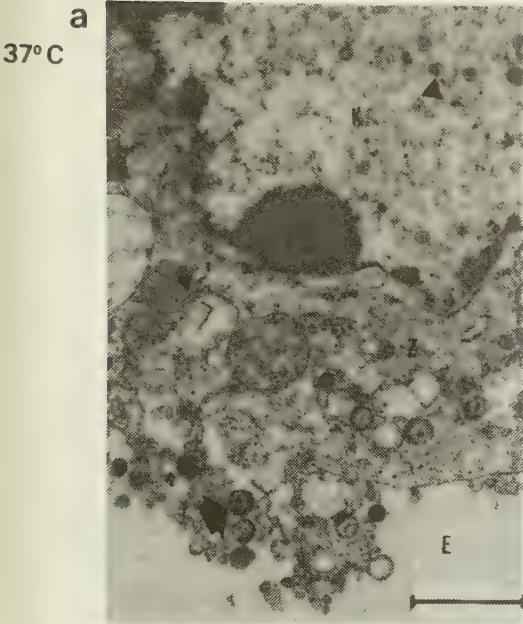
dicker Pfeil : intakte Virionen mit Einlagerungen aus
elektronendichtem Material zwischen
Kapsid und Hülle

weisser Pfeil : elektronendichte runde Körper ohne
Innenstruktur

Die Länge der Balken entspricht 1µm

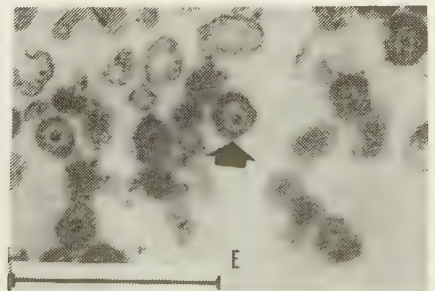
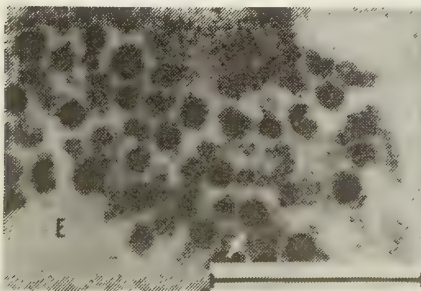
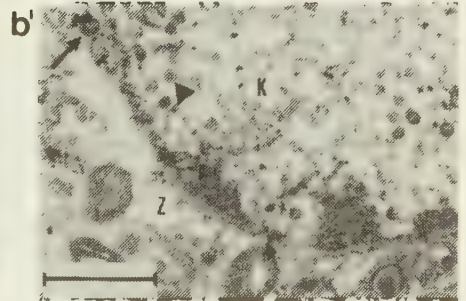
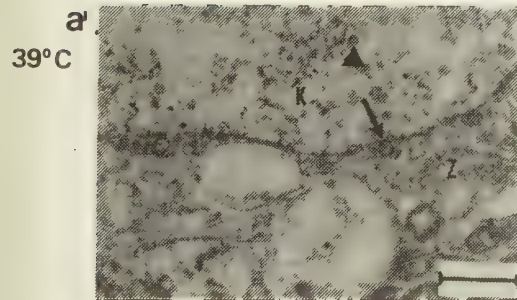
STAMM RLB 106

STAMM JURA 78



STAMM RLB 106

STAMM JURA 78



4. DISKUSSION

a) Das Phänomen der Temperatursensitivität

Die Temperatursensitivität und damit auch die Identität des verwendeten Virusstammes RLB 106 konnte anhand seines unterschiedlichen Wachstumsverhaltens bei 37°C (Stamm RLB/37°C) und 39°C (Stamm RLB/39°C) eindeutig nachgewiesen werden. Bei 37°C produzierte Stamm RLB infektiöses Nachkommenvirus. Die Effizienz der Virusproduktion war dabei geringer als diejenige des Stammes Jura 78 (Stamm Jura/37°C). Wie eigene, nicht gezeigte Untersuchungen ergaben, war bei einer Temperatur von 35°C die Virusproduktion beider Stämme vergleichbar hoch, und die Mutante formte deutlich grössere Plaques als bei 37°C. In Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Zygraich et al. (1974 a, b) sprechen diese Resultate dafür, dass die Temperatursensitivität nicht plötzlich bei einer kritischen Schwelle einsetzt, sondern sich mit steigender Temperatur zunehmend akzentuiert.

Unter restriktiven Bedingungen wurden die mit Stamm RLB primär infizierten Zellen zerstört und dabei die gleichen serologisch nachweisbaren virusinduzierten Proteine wie bei 37°C gebildet. Die Synthese viraler Proteine setzte früher ein als unter permissiven Bedingungen, vermutlich infolge einer allgemeinen Beschleunigung der biochemischen Vorgänge bei erhöhter Temperatur. Die gesamte Syntheserate war jedoch reduziert. Infektiöse Viruspartikel wurden höchstens in sehr geringer Zahl produziert.

Virusassoziierte Proteine ausserhalb der Zelle liessen sich verglichen mit Stamm Jura 78 bei 39°C (Stamm Jura/39°C) erst sehr spät und in geringer Konzentration nachweisen.

Die beobachtete Persistenz des Stammes RLB in Zellkulturen bei 39°C spricht dafür, dass die Temperatursensitivität nicht absolut ist. So war das Virus während 168 Stunden nachweisbar, ohne sichtbare zytopathische Effekte zu verursachen. Bei den nachgewiesenen infektiösen Viruspartikeln kann es sich

grundsätzlich um Virus aus dem Inokulum oder um Nachkommenvirus handeln. Die in der Untersuchung über die Kinetik der Virusvermehrung festgestellte relative Temperaturlabilität des Stammes RLB (bei 37°C verlieren 50% der Viruspartikel innerhalb von zehn Stunden ihre Infektiosität) lässt allerdings die Bildung einer geringen Anzahl infektiöser Nachkommenviren vermuten, da andernfalls eine deutliche Abnahme des Virustiters erwartet werden müsste. Die Unversehrtheit des Zellrasens liesse sich damit erklären, dass die wenigen primär infizierten und zerstörten Zellen durch neue ersetzt wurden.

Die Bestimmung der Virustiter von Stamm RLB bei 39°C hat gezeigt, dass die Resultate einzig von der Multiplizität abhängen. Titriert man nämlich dieselbe Virussuspension des Stammes RLB unter restriktiven Bedingungen auf Mikrotiterplatten (1×10^4 Zellen/Delle) und auf Makrotiterplatten (2×10^5 Zellen/Delle), so differieren die errechneten Virustiter ungefähr um einen Faktor zehn, entsprechend den sich ergebenden unterschiedlichen Multiplizitäten.

b) Expression viraler Proteine und Antigene

Unter permissiven Bedingungen unterscheidet sich der temperatursensitive Stamm RLB in der Expression von VP 26, VP I und VP o deutlich vom Stamm Jura. VP 26 wanderte in der SDS-PAGE langsamer, VP I schneller, und VP o liess sich fluorographisch nicht darstellen. Unterschiedliche Molekulargewichte von VP I und VP 26 konnten auch bei anderen BHV-1 Stämmen beobachtet werden (Metzler et al., 1985). Das Verhalten bezüglich VP o ist dagegen bei keinem anderen BHV-1 Stamm beschrieben. Die Frage, ob diese Eigenheiten ursprüngliche Eigenschaften darstellen, oder aber ganz oder teilweise auf die Mutagenisierung zurückzuführen sind, könnte nur anhand einer Proteinanalyse des ursprünglichen Virus einwandfrei beantwortet werden.

Untersuchungen mit einem Serum, das vor seiner Verwendung im Immunoblot auf infizierten Zellkulturen adsorbiert worden war, zeigten, dass die antigen bedeutsamen Strukturen der beiden Stämme in vergleichbarer Form exprimiert

werden. Dies betrifft insbesondere VP o und VP o', die auch bei Stamm RLB vorhanden sein müssen, da sie antigen wirksam sind. Das Strukturprotein VP 9 wies geringgradige Antigenunterschiede zwischen den beiden Virusstämmen auf. Die je nach verwendetem Serum variierende Nachweisbarkeit dieser Unterschiede widerspiegelt individuelle Unterschiede in der Immunreaktion verschiedener Tiere.

Die in dieser Arbeit dargelegten serologischen Untersuchungen sind mit spezifischen Rinderantisera gegen Stamm Jura durchgeführt worden. Um die Antwort des Immunsystems auf die Mutante genauer abzuklären, wäre es wünschenswert, die Versuche auch mit spezifischen Antisera gegen Stamm RLB durchzuführen. Dabei dürften allerdings die niedrigen Antikörpertiter vakzinierter Tiere Probleme bereiten (Lazarowicz et al., 1983), da hochtitrige Seren ausschlaggebend für die Qualität der Ergebnisse serologischer Nachweisverfahren sind. Das Fehlen von spezifischem Antiserum gegen Stamm RLB konnte weitgehend durch Voradsorption der Seren auf RLB, bzw. auf Jura infizierten Zellen aufgewogen werden.

Eine Differenzierung der beiden Virusstämme war auch mit den verwendeten monoklonalen Antikörpern nicht möglich.

Da die oben beschriebenen Unterschiede in der Proteinexpression der beiden Stämme offenbar keine wichtigen antigenen Strukturen betreffen, können sie sero-diagnostisch nicht ausgewertet werden. Dies umso mehr, als Stamm RLB bei geimpften Tieren nur niedrige Antikörpertiter zu induzieren vermag (Lazarowicz et al., 1983).

Die von Stamm RLB unter restriktiven Bedingungen produzierten Proteine waren vergleichbar mit denjenigen, die bei 37°C gebildet wurden. Mehrere zeigten jedoch quantitative und/oder qualitative Unterschiede. So wies VP 11 der Mutante ein geringeres Molekulargewicht auf, und reagierte nur schwach mit einem spezifischen MC. Das Glykoprotein gVP 3/12 wurde wenig

synthetisiert und von einem spezifischen MC nicht erkannt. VP 20 und VP 21 wurden schwach exprimiert. Das Hauptkapsidprotein VP 4, das im fluorographischen Nachweisverfahren in der Zellfraktion in vergleichbarer Konzentration wie die meisten anderen Strukturproteine gefunden wurde, war im Zellkulturüberstand deutlich untervertreten. GVP 17A und gVP 7/17/23 dagegen wurden wie bei 37°C ausgebildet.

c) Morphogenese

Anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass von Stamm RLB unter restriktiven Bedingungen Viruspartikel ausgebildet werden, die nur unvollständig reifen. Die im Zellkern erkennbaren Kapside waren morphologisch nicht von den unter permissiven Bedingungen entstandenen zu unterscheiden. Ebenso erfolgte die Sprossung der Kapside an der Kernmembran offenbar analog wie bei 37°C. Die Einlagerung von elektronendichtem Material zwischen Kapsid und Hülle dagegen fand nicht in einer vergleichbaren Art statt, und die Viruspartikel ausserhalb der Zelle erschienen morphologisch verändert und wiesen einen geringeren Durchmesser auf. Eine Hülle schien indessen vorhanden zu sein. Das Kontrastmittel wies zu diesen Partikeln eine grössere Affinität auf, als zu den intranukleär gelegenen Kapsiden, was darauf hindeutet, dass das Kapsid sich im Verlaufe der Virusreplikation veränderte.

Das elektronendichte Material zwischen Kapsid und Hülle der Herpesviren wird von Wildy (1986) und von Roizmann und Batterson (1985) als Tegument bezeichnet. Marshall et al. (1986) beschrieben VP 11 als ein eng mit der Hülle und dem Kapsid vergesellschaftetes Strukturprotein. Sie postulierten, dass es sich bei VP 11 um einen Hauptbestandteil des Teguments handelt. Valícek und Smíd (1976) beobachteten, dass behüllte Viruspartikel in der perinukleären Zisterne kein elektronendichtes Material zwischen Kapsid und Hülle aufweisen, wohl aber Virionen im Zytoplasma. Dies ist ein Hinweis darauf, dass das Tegument nach der Sprossung reift.

Die unter restriktiven Bedingungen veränderte Synthese von VP 11 könnte die Beeinträchtigung in der Entwicklung des Teguments bei 39°C erklären. Wie bereits erwähnt, zeigte der Stamm RLB bereits bei 37°C temperatursensitive Eigenschaften, und er erwies sich verglichen mit Stamm Jura als thermolabil. Es bleibt abzuklären, ob VP 11 schon bei 37°C zumindest teilweise in veränderter Form gebildet wird, und dadurch für die Thermolabilität verantwortlich ist. Ob VP 20 und VP 21 ebenfalls Bestandteile des Teguments sind, bleibt abzuklären. Die stark herabgesetzte Synthese dieser beiden Strukturproteine und das Tegument als einzige morphologisch nicht eindeutig ausgebildete Strukturkomponente bei 39°C sprechen allerdings dafür. Das Fehlen des Teguments, bzw. der Einbau eines rudimentären Teguments könnte den geringeren Durchmesser der extrazellulären Viruspartikel bedingen.

d) Virusfreisetzung aus der Zelle

Es konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung von Viruspartikeln des Stammes RLB/39°C verglichen mit Stamm Jura zumindest stark verzögert ist. Die Freisetzung von Herpesviren steht in engem Zusammenhang mit post-translationellen Glykosylierungsprozessen, die im Golgi Apparat ablaufen (Roizman und Batterson, 1985). Die Beeinträchtigung dieser Prozesse mit Monensin hemmt die Freisetzung von BHV-1 (Van Drunen Littel-Van den Hurk und Babiuk, 1985). Bisher ist nicht klar, ob nur einzelne, oder alle Glykoproteine für die Freisetzung verantwortlich sind. Unsere Beobachtung, dass sich gVP 3/12 des Stammes RLB/39°C sowohl quantitativ als auch antigen deutlich verändert manifestierte, ist ein Hinweis auf die mögliche Bedeutung dieses Proteins für die Virusfreisetzung.

Glykoproteine spielen im weiteren eine zentrale Rolle bei der Virusadsorption und Penetration (Van Drunen Littel-van den Hurk und Babiuk, 1985). So konnten Okazaki und Mitarbeiter (1987) die Adsorption von BHV-1 mit einem monoklonalen Antikörper gegen gVP 3/12 hemmen, während die nachfolgende Penetration durch einen gVP 17A spezifischen MC verhindert werden konnte. Nicht gezeigte eigene Untersuchungsergebnisse mit radioaktiv markierten

Viruspartikeln sprechen dafür, dass die vom Stamm RLB unter restriktiven Bedingungen freigesetzten Viruspartikel nicht an Zellen adsorbieren. Die mögliche Bedeutung von gVP 3/12 für den Adsorptionsprozess bedarf der weiteren Abklärung. Dies umsomehr, als das analoge Protein bei Herpes simplex Virus zumindest für die Vermehrung in der Zellkultur nicht essentiell ist (Zezulak und Spear, 1984). Weiter ist beim Pseudorabies Virus bekannt, dass Stämme, die auf dem zu gVP 3/12 analogen Protein (gIII) Mutationen aufweisen, weniger effizient freigesetzt werden, bzw. eine reduzierte Stabilität aufweisen (Ryan et al., 1987).

Die verminderte Expression von gVP 3/12 und seine veränderte antigene Struktur unter restriktiven Bedingungen könnten die Ursache für einen Defekt in der Freisetzung vom Stamm RLB aus der Zelle sein.

Viruspartikel können durch Schädigung der Zellmembran infolge der Virusvermehrung freigesetzt werden. Die Beobachtung, dass die in der Virushülle lokalisierten Glykoproteine mit Ausnahme von gVP 3/12 im Zellkulturüberstand in ebenso hoher Konzentration nachzuweisen waren wie die meisten übrigen Strukturproteine, spricht dafür, dass die Hülle dabei nicht verlorengeht. Im elektronenoptischen Nachweisverfahren mittels Negativkontrast liessen sich im Zellkulturüberstand dagegen keine behüllten Viren zeigen. Vermutlich verloren die Kapside ihre Hülle bei der Fixation und Kontrastierung. Ein verminderter Zusammenhalt zwischen der Hülle und den übrigen Strukturkomponenten lässt sich durch das veränderte Tegument erklären.

Die unter restriktiven Bedingungen festgestellten Defekte im Tegument von Stamm RLB und die gehemmte Freisetzung von Partikeln lassen dieses Virus als geeignetes Modell für die eingehendere Untersuchung der Virusmaturation und Freisetzung erscheinen. Dies auch deshalb, weil ein Temperaturwechsel allein genügt, um die Defekte zu provozieren.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der Vergleich eines temperatursensitiven Impfstammes (RLB 106) mit einem Feldstamm (Jura 78) zeigte, dass sich die beiden Stämme bei einer Wachstumstemperatur von 37°C in der Expression von drei mit VP 26, VP I und VP o bezeichneten Proteinen unterschieden. VP 26 von Stamm RLB 106 wanderte in der Gelelektrophorese langsamer, VP I schneller und VP o liess sich fluorographisch nicht darstellen. Serologische Untersuchungen mittels Immunoblot und Radioimmunpräzipitation unter Verwendung von Seren und monoklonalen Antikörpern ergaben, dass sich die Stämme in Bezug auf ihre wichtigsten antigenen Strukturen nicht unterscheiden.

Bei einer Wachstumstemperatur von 39°C wurde vom Impfstamm ein mit gVP 3/12 bezeichnetes Glykoprotein nur sehr schwach exprimiert, und war mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper nicht nachweisbar. Das mit VP 11 bezeichnete Tegumentprotein unterschied sich durch ein niedrigeres Molekulargewicht und wurde von einem spezifischen monoklonalen Antikörper nur in geringem Ausmass erkannt. Anhand elektronenmikroskopischer Abklärungen liess sich zeigen, dass vom Impfstamm bei 39°C Viruspartikel ausgebildet wurden, die sich nur unvollständig entwickelten. So fand eine Sprossung von Nukleokapsiden an der Kernmembran statt, eine nachfolgende Reifung des Teguments erfolgte jedoch nicht wie bei 37°C, und extrazelluläre Viruspartikel schienen defekt zu sein. Die Untersuchung des Wachstumsverhaltens ergab, dass vom Impfstamm bei 39°C geringe Mengen an infektiösen Virionen produziert wurden, und dass die Freisetzung von Viruspartikeln deutlich gehemmt war.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Bonin, O. (1973):

Titerberechnung bei den Endverdünnungsmethoden. In: Quantitativ-virologische Methodik. O. Bonin (Hrsg.), Verlag Georg Thieme, Stuttgart.

Friedli, K. und Metzler, A.E. (1987):

Reactivity of monoclonal antibodies to proteins of a neurotropic bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strain and to proteins of representative BHV-1 strains. Arch. Virol. 94: 109-122.

Gibbs, E.P.J. und Rweyemamu, M.M. (1977):

Bovine herpesviruses. Part I. Bovine herpesvirus 1. Vet. Bull. 47: 317-343.

Jasty, V. und Chang, P.W. (1971):

Envelopment of infectious bovine rhinotracheitis viral particles in bovine kidney cell cultures: An electron microscopic study. Am. J. Vet. Res. 32: 1945-1953.

Laemmli, U.K. (1970):

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 227: 680-685.

Lazarowicz, M., Steck, F., Ackermann, M. und Kihm, U. (1983):

Prüfung von zwei Impfstoffen gegen die Infektiöse Bovine Rhinotracheitis. Schweiz. Arch. Tierheilk. 125: 797-808.

Mann, D.D., Buening, G.M. und Thorne, J.G. (1983):

Efficacy of aerosol, intranasal and intramuscular vaccination against selected bovine viral diseases. Cornell Vet. 73: 375-379.

Marshall, R.L., Rodríguez, L.L. und Letchworth, G.J. (1986):

Characterization of envelope proteins of infectious bovine rhinotracheitis virus (bovine herpesvirus 1) by biochemical and immunological methods. J. Virol. 57: 745-753.

Mayr, A., Eissner, G. und Mayr-Bibrach, B. (1984):

Infektiöse Bovine Rhinotracheitis und Infektiöse Pustulöse Vulvovaginitis (IBR/IPV). In: Handbuch der Schutzimpfungen in der Tiermedizin. A. Mayr, G. Eissner und B. Mayr-Bibrach (Hrsg.), Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.

Metzler, A.E., Matile, H., Gassmann, U., Engels, M. und Wyler, R. (1985):

European isolates of bovine herpesvirus 1: A comparison of restriction endonuclease sites, polypeptides, and reactivity with monoclonal antibodies. Arch. Virol. 85: 57-69.

Metzler, A.E., Schudel, A.A. und Engels, M. (1986):

Bovine Herpesvirus 1: Molecular and antigenic characteristics of variant viruses isolated from calves with neurological disease. Arch. Virol. 87: 205-217.

Misra, V., Blumenthal, R.M. und Babiuk, L.A. (1981):

Proteins specified by bovine herpesvirus 1 (infectious bovine rhinotracheitis virus). J. Virol. 40: 367-378.

Nettleton, P.F., Sharp, J.M., Herring, A.J. und Herring, J.A. (1984):

Infectious bovine rhinotracheitis virus excretion after vaccination, challenge and immunosuppression. In: Latent herpes virus infections in veterinary medicine. G. Wittmann, R.M. Gaskell, und H.-J. Rziha (Hrsg.), Verlag Martinus Nijhoff, Boston, Den Haag, Dordrecht, Lancaster.

Okazaki, K., Kawakura, H., Okada, M., Honda, E., Minetoma, T. und Kumagai, T. (1987):

Intracellular localization and transport of three different bovine herpesvirus type 1 glycoproteins involved in neutralization. *Arch. Virol.* 92: 17-26.

Pastoret, P.P., Babiuk, L.A., Misra, V. und Griebel, P. (1980):

Reactivation of temperature-sensitive and non-temperature-sensitive infectious bovine rhinotracheitis vaccine virus with dexamethasone. *Infect. Immun.* 29: 483-488.

Probst, U., Wyler, R., Kihm, U., Ackermann, M., Bruckner, L., Müller, H.K. und Ehrensperger, F. (1985):

Zur IBR-Virus-Ausscheidung experimentell infizierter Kühe insbesondere in der Milch. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 127: 723-733.

Roizman, B. und Batterson, W. (1985):

Herpesviruses and their replication. In: *Virology*. B.N. Fields (Hrsg.), Verlag Raven Press, New York.

Roizman, B. und Spear, P. (1973):

Herpesviruses. In: *Ultrastructure of animal viruses and bacteriophages: An atlas*. A.J. Dalton und F. Haguenau (Hrsg.), Verlag Academic Press, Inc., New York und London.

Ryan, J. P., Whealy, M.E., Robbins, A.K. und Enquist, L.W. (1987):

Analysis of pseudorabies virus glycoprotein gIII localization and modification by using novel infectious viral mutants carrying unique Eco R1 sites. *J. Virol.* 61: 2962-2972.

Thiry, E., Pastoret, P.P., Brochier, B., Kettmann, R. und Burny, A. (1983):
Différenciation de souches du virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine
(Bovine herpesvirus 1) par l'analyse du DNA viral après digestion par
l'endonucléase de restriction Eco R1. Ann. Méd. Vét. 127: 29-36.

Valíček, L. und Smíd, B. (1976):

Envelopment and the envelopes of infectious bovine rhinotracheitis virus in
ultrathin sections. Arch. Virol. 51: 131-140.

Van Drunen Littel-Van den Hurk, S. und Babiuk, L.A. (1985):

Effect of tunicamycin and monensin on biosynthesis, transport, and maturation
of bovine herpesvirus type-1 glycoproteins. Virology 143: 104-118.

Whetstone, C.A., Wheeler, J.G. und Reed, D.E. (1986):

Investigation of possible vaccine-induced epizootics of infectious bovine
rhinotracheitis, using restriction endonuclease analysis of viral DNA. Am. J. Vet.
Res. 47: 1789-1795.

Wildy, P. (1986):

Herpesvirus. Intervirology 25: 117-140.

Zezulak, K.M. und Spear, P.G. (1984):

Mapping of the structural gene for the herpes simplex virus type 2 counterpart of
herpes simplex virus type 1 glycoprotein C and identification of a type 2 mutant
which does not express this glycoprotein.

J. Virol. 49: 741-747.

Zygraich, N., Lobmann, M., Vascoboinic, E., Berge, E. und Huygelen, C.
(1974 a):

In vivo and in vitro properties of a temperature sensitive mutant of infectious
bovine rhinotracheitis virus. Res. vet. Sci. 16: 328-335.

Zygraich, N., Vascoboinic, E. und Huygelen, C. (1974 b):

Replication of a temperature sensitive mutant of infectious bovine rhinotracheitis virus in the tissues of inoculated calves. Zbl. Vet. Med. B 21: 138-144.

7. VERDANKUNGEN

An dieser Stelle möchte ich allen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, meinen herzlichsten Dank aussprechen.

-Herrn Prof. Dr. R. Wyler für die Überlassung des Themas und das Referat.

-Herrn Prof. Dr. E. Peterhans für die Übernahme des Korreferates.

-Herrn Dr. A. E. Metzler für die grosszügige und kompetente Leitung der Arbeit.

-Herrn Beat Scheier für die Hilfe bei der Anfertigung der Immunoblots.

-Herrn PD Dr. P. Wild und Frl. Elisabeth Schraner für die Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

-Frau A. Hug für fotografische Arbeiten.

-Meiner Ehefrau

8. LEBENSLAUF

6.7.1958	Geboren in Zürich als jüngerer Sohn von Jean und Léonie Leutenegger
1965-1971	Primarschule in Wallisellen (ZH)
1971-1972	Sekundarschule in Greifensee (ZH)
1972-1978	Gymnasium in Wetzikon (ZH)
1978	Maturität Typus B
1978-1983	Studium der Veterinärmedizin an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Zürich
Oktober 1983	Tierärztliches Staatsexamen
Januar 1984-Juni 1985	Assistent an der Tierklinik Nesslau (SG)
Juli 1985-März 1986	Diverse Anstellungen in verschiedenen Praxen
31.8.1985	Verheiratung mit Carla Aste
April 1986-März 1987	Assistent in der Praxis Dres. med. vet. G. Blaser und D. Sennhauser in Aarberg (BE)
April-Dezember 1987	Assistent am Institut für Virologie der Universität Zürich
Seit Januar 1988	Assistent an der Tierklinik Nesslau (SG)

